

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Efecto de la actividad metabólica de cepas de hongos
antagonistas sobre alternaria alternata (fr.) Causante
de la mancha parda en cítricos**

TESIS

**Para optar al Título Profesional de Biólogo, con mención en Microbiología
y Parasitología**

AUTOR

José Antonio Camarena Lizarzaburu

ASESOR

Pedro Luis Castellanos Sánchez

Lima – Perú

2012

DEDICATORIA

A DIOS

Quien siempre me acompaña, por permitirme culminar esta etapa de mi vida.

A mis padres

Matías Camarena Romero y Gelda Lizarzaburu Cieza, por los esfuerzos y sacrificios para brindarme una profesión que es la mejor herencia que pudieron darme y por su apoyo incondicional en mi desarrollo personal y profesional.

A mis hermanos

Por su confianza, comprensión y cariño que siempre han demostrado.

*Muchos sueñan con alcanzar sus metas.
Otros preferimos mantenernos despiertos
para hacer nuestros sueños realidad.*

AGRADECIMIENTOS

Debo expresar mi sincero agradecimiento:

Mi pleno reconocimiento al Ph.D. Pedro Luis Castellanos Sánchez, profesor investigador de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su ayuda invaluable en la elaboración de la presente tesis.

A los Ingenieros Luis Valdiviezo, Hilda Gómez y Willy Soberanis, especialistas del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), por su apoyo y sugerencias, paciencia, confianza y amistad recibida.

A la Blga. Anny Zapata Granja, por su apoyo metodológico y que siempre estuvo atenta a mis inquietudes profesionales, a ella mi eterna gratitud.

A la Dra. Elizabeth Nuñez, por sus aportes, colaboración, pero sobre todo su amistad.

A los Ingenieros Karina Tokashiki e Ynes Quispe, por haberme permitido realizar los ensayos en el fundo San Hipólito “Arona” perteneciente al Sr. Luis Alayza de Losada.

A mis amigos y compañeros de SENASA, por su amistad, acertados consejos, con quienes compartí momentos inolvidables: Cledy Ureta, Martín Tenorio, Carlos Ninahuanca, y César Carvallo.

A Liz Mayra Isabel, por su amor, confianza, paciencia, comprensión, apoyo, consejos y comentarios. Por estar a mi lado y ayudarme a mantenerme despierto.

Gracias a todos...

ABREVIATURAS

ha	Hectárea
Kg	Kilogramo
cm	Centímetro
TM	Toneladas métricas
MIP	Manejo integrado de plagas
mL	mililitro
rpm	revoluciones por minuto
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Agraria
µg	microgramo
µm	micrometro
CNB	Cámara de Neubauer
ADE	Agua destilada estéril
APD	Agar papa dextrosa
PICR	Porcentaje de inhibición de crecimiento radial
ACB	Agente de Control Biológico

ÍNDICE

	Pág.
I.- Introducción.....	1
II.- Marco teórico.....	4
2.1.- Historia y origen de los cítricos.....	4
2.1.1.- Taxonomía y morfología.....	7
2.1.2.- Ecología.....	8
2.1.3.- Importancia económica.....	9
2.2.- Enfermedades de los cítricos.....	11
2.2.1.- La enfermedad: “Mancha parda de los cítricos”.....	11
2.2.2.- Taxonomía y morfología.....	12
2.2.3.- Ecología.....	13
2.2.4.- Daño económico.....	14
2.2.5.- Alternativas de control y medidas de combate.....	14
2.3.- Control biológico de enfermedades.....	15
2.3.1.- Los hongos como agentes de control biológico.....	16
2.3.2.- Microorganismos antagonicos.....	17
2.3.3.- <i>Trichoderma</i> spp.....	18
2.3.4.- Taxonomía y morfología de <i>Trichoderma</i> spp.....	19
2.4.- Importancia del metabolismo secundario.....	21
2.4.1.- Hongos productores antifúngicos.....	21
2.4.2.- Metabolismo secundario.....	22
2.4.3.- Pigmentos.....	23
2.5.- Efecto de los agroquímicos sobre la microbiología de la superficie aérea de las plantas.....	23
2.5.1.- Efecto de fungicidas.....	24
III.- Materiales y métodos.....	26
3.1.- Localización del área de estudio.....	26
3.2.- Selección de hongos com propiedades antagonistas sobre <i>Alternaria alternata</i>	26
3.2.1.-Activación de las cepas antagonistas y fitopatógena.....	26

3.2.2.- Preparación de la suspensión de hongos.....	27
3.2.3.- Evaluación de la actividad de los hongos frente a <i>A. alternata</i>	27
3.2.3.1.- Selección del hongo antagonista con mayor efecto biocontrolador.....	27
3.3.- Producción de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria a partir de cultivos líquidos en caldo papa dextrosa (PD).....	28
3.3.1.- Aplicación del filtrado.....	29
3.4.- Medición de la actividad inhibitoria del crecimiento del fitopatógeno.....	29
3.5.- Determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR).....	29
3.6.- Protocolo del bioensayo en campo.....	30
3.6.1.- Localización.....	30
3.6.2.- Establecimiento de la zona experimental.....	30
3.6.3.- Factor en estudio.....	31
3.6.4.- Unidades de observación.....	31
3.6.5.- Aplicación de cada tratamiento al cultivo de cítrico.....	32
3.6.6.- Determinación de la incidencia de la enfermedad.....	32
3.6.7.- Determinación de la severidad de la enfermedad.....	33
3.6.8.- Determinación de la eficiencia de los productos.....	33
4.7.- Análisis estadístico.....	34
IV.- Resultados.....	35
4.1.- Selección de cepas de hongos con mayor propiedad antagónica sobre <i>Alternaria alternata</i>	35
4.2.- Efecto del filtrado obtenido de la cepa seleccionada sobre el crecimiento de <i>Alternaria alternata</i>	39
4.3.- Pruebas de campo.....	42
4.3.1.- Localización del área del estudio.....	42
4.3.2.- Efecto de los filtrados obtenidos de la cepa <i>Trichoderma R6</i> en el control de la mancha parda en cítricos en campo... ..	42
4.3.2.1.- Incidencia de la mancha parda de los cítricos en campo.....	42

4.3.2.2.- Severidad de la enfermedad mancha parda sobre el cultivo de cítricos.....	43
4.3.2.3.- Efecto de productos utilizados para el control de la mancha parda de los cítricos	47
V.- Discusión.....	48
5.1.- Selección de cepas de hongos con mayor propiedad antagónica sobre <i>Alternaria alternata</i>	48
5.2.- Efecto del filtrado obtenido de <i>Trichoderma R6</i> sobre el crecimiento de <i>Alternaria alternata</i>	51
5.3.- Pruebas de campo.....	55
5.3.1.- Incidencia de la enfermedad mancha parda de los cítricos en campo.....	55
6.3.2.- Severidad de la enfermedad mancha parda sobre el cultivo de los cítricos.....	56
6.3.3.- Efecto de productos utilizados para el control de la mancha de los cítricos.....	56
VI.- Conclusiones.....	58
VII.- Recomendaciones.....	59
VIII.- Referencias Bibliográficas.....	60
IX.- Anexo.....	76

FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Cultivo dual para evaluar PICR de hongos antagonistas y fitopatógeno.	37
Figura 2. Observación microscópica a las 120 horas para evaluar la interacción entre los hongos enfrentados.	38
Figura 3. Obtención de tres filtrados del fermento de cultivo (caldo Papa Dextrosa) de las tres cepas antagonistas con mejores resultados.	40
Figura 4. Tendencia de las curvas de los valores de PICR de los filtrados de las tres cepas.	41
Figura 5. Porcentaje de incidencia del hongo <i>Alternaria alternata</i> en el cultivo de cítricos.	42
Figura 6. Porcentaje de gravedad de la enfermedad mancha parda en el cultivo de cítricos.	43
Figura 7. Efecto de dosis los productos utilizados para el control de “la mancha parda” en el cultivo de los cítricos.	47

TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Escala de antagonismo.	30
Tabla 2. Determinación de tratamientos aplicados para el control de “la mancha parda” en cítricos.	31
Tabla 3. Escala de Horsfall- Barrat para evaluar la mancha foliar de cítricos.	33
Tabla 4. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de <i>Alternaria alternata</i> enfrentado con cada una de las cepas antagonistas evaluadas.	35
Tabla 5. Valores promedios de PICR de enfrentamiento entre posibles hongos antagonistas en comparación frente al testigo.	36
Tabla 6. Tipos de interacción hifal entre las cepas antagonistas y el fitopatógeno <i>Alternaria alternata</i> .	38
Tabla 7. Características de los filtrados fúngicos producidos en el medio líquido, caldo Papa Dextrosa.	39
Tabla 8. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de <i>Alternaria alternata</i> en medio PDA conteniendo los metabolitos inhibitorios de la cepas antagonistas evaluadas.	41
Tabla 9. Valores del PICR del hongo fitopatógeno <i>A. alternata</i> en medio PDA (testigo) y PDA más los filtrados de las cepas Tv, Th y Tr6.	41
Tabla 10. Valores de porcentaje de incidencia y severidad del tratamiento con el filtrado (actividad metabólica inhibitoria) de hongo antagonista T. R6.	44
Tabla 11. Valores de porcentaje de incidencia y severidad del tratamiento con producto de arroz con conidios de hongo antagonista T. R6.	44
Tabla 12. Valores de porcentaje de incidencia y severidad del tratamiento con producto químico (testigo).	45
Tabla 13. Valores de grado de incidencia y severidad de cada tratamiento	46

RESUMEN

La mancha parda es una enfermedad causada por el hongo *Alternaria alternata* (Fr.), que afecta a mandarinas, en especial a una gran variedad de sus híbridos; sin embargo, cuando se tiene una concentración alta de inóculo cercano a otras variedades no susceptibles, puede causar daños apreciables en estos. La enfermedad afecta a órganos jóvenes causando necrosamiento, defoliación, lesiones necróticas y erupciones suberosas en frutos que reduce su valor en el mercado. El control de este patógeno se ha realizado hasta nuestros días con el empleo de fungicidas químicos que presentan desventajas económicas y ecológicas por lo agresivo y costoso que resultan al medio ambiente.

En el presente trabajo, se evaluaron 7 cepas fúngicas de los géneros *Trichoderma* (5), *Pochonia* (1) y *Clonostachys* (1), para seleccionar un agente de control biológico (ACB) promisorio para el control de *A. alternata* en dependencia de los resultados *in vitro*. Se hizo la selección de la cepa, *Trichoderma* R6, que presentó un mayor control del fitopatógeno mediante las pruebas *in vitro*: cultivos duales, observación microscópica, y evaluación de filtrados conteniendo sustancias biológicas inhibitorias. La cepa seleccionada fue evaluada frente a *A. alternata* en plantas de cítricos de mandarina variedad Fortune en campo, a partir de la época de brotamiento, el estadio fenológico más susceptible de la planta, se aplicaron tres tratamientos: filtrado obteniendo un control de 58,33% del fitopatógeno, y comparándolo con los otros dos, conidios en arroz y fungicidas químicos, con resultados de 50,0% y 48,52%, respectivamente.

Palabras clave: Control biológico, cítricos, *Alternaria alternata*, *Trichoderma* R6, estadio fenológico.

ABSTRACT

The Alternaria Brown Spot (ABS) is a plant disease caused by the fungus *Alternaria alternata* (Fr.) that attacks tangerines and the varieties of their hybrids, although it may cause considerable lesions on unsusceptible varieties if they are adjacent to heavily infested plants as high inoculum concentrations. Alternaria Brown Spot (ABS) attacks young fruit, leaves and twigs causing brown-to-black necrotic lesions surrounded by a yellow halo, defoliation and large sunken pockmarks, thus reducing the value of the fruit for the fresh market. Nowadays, fungicides are the primary way of controlling Alternaria Brown Spot. However, this practice has economic and ecological disadvantages because of its higher costs and the aggressiveness against the environment.

The objectives of this study were to evaluate 7 fungal species and choose the best one as a biological control agent (BCA) to the control of *Alternaria alternata* based on *in vitro* results. Consequently, we have selected *Trichoderma R6* that showed better results through evaluations *in vitro*: dual cultures, microscopic observations, and evaluation of inhibitory substances filtrates.

Trichoderma R6 was evaluated in a field of tangerines citrus Fortune variety cultivars since the bud break (vegetative) stage, most susceptible phenological stage against this disease. The filtrate obtained from the selected fungal species got the control 58,33% of phytopathogen in comparison with the 50,0% and 48,52% obtained with conidia on rice and chemical fungicides application respectively.

Key words: Biological control, citrus cultivars, *Alternaria alternata*, *Trichoderma R6*, phenological stage.

I.- INTRODUCCIÓN

La citricultura es una actividad agrícola, que en el Perú representa una línea de cultivo emergente; los cítricos son la especie frutal que ocupa un lugar expectante y ascendente en nuestra exportación en los últimos años (Ministerio de Agricultura, 2011). Las exportaciones totales de cítricos al mundo fueron de aproximadamente 64 mil toneladas para el año 2010, dentro de este grupo se destaca a la mandarina y todas sus variedades, producto estrella con 71% del total exportado. Le siguen en orden de volumen las naranjas (25%) y en menor cantidad se encuentran las limas, limones y las toronjas (4%).

Es preciso destacar que la producción de cítricos en el Perú se da durante todo el año, así como la producción de mandarinas y naranjas se incrementan notablemente durante el periodo de Marzo a Octubre, situación que se presenta favorable para la exportación de frutos cítricos al mercado chino (uno de nuestros principales destinos) en la temporada en que China no lo hace. Las mandarinas alcanzan las 33 mil toneladas, durante dicho periodo, mientras que las naranjas lo hacen con un valor de 13 mil toneladas. De igual manera en Piura y Lambayeque, concentran más del 70 por ciento de la producción nacional de limones, mientras que Junín lidera la categoría de naranjas de jugo, así como Lima e Ica el segmento de mandarinas y naranjas de mesa. Además, la producción de derivados ha presentado una tendencia creciente, debido a la mayor demanda de estos en el mercado externo; no obstante, los agricultores presentan dificultades para mantener una alta calidad de los productos y una considerable oferta a través del tiempo.

Las zonas de mayor producción de cítricos poseen diversos climas: árido, tropical y subtropical con temperaturas que varían entre 13 y 25°C y humedad relativa entre 70 y 80%; estas características climatológicas pueden favorecer el cultivo de cítricos; sin embargo, estas mismas condiciones también favorecen la proliferación de hongos fitopatógenos como *Alternaria alternata* (Fr.), que ataca produciendo lesiones cancrasas, necrosamiento de brotes, ocasionando grandes pérdidas económicas a los citricultores (Ruesta y Rodríguez, 1992).

En nuestro país se observó por primera vez “la mancha parda de los cítricos” en Satipo, Junín (2003); extendiéndose por las zonas de ceja de Selva, donde causó pérdidas económicas muy serias y en varios casos, la eliminación de plantaciones enteras, Marín *et al.* (2006). Las primeras detecciones en costa central fueron en Cañete y Chíncha (2007), en la Irrigación Santa Rosa (2008) y en Huaral (2009), (Gainza, 2009. En: Procitrus, Boletín informativo trimestral N° 43).

Por todo lo expuesto, el control biológico utilizando hongos filamentosos como agentes biocontroladores que son productores de metabolitos biológicamente activos constituyen hoy en día una alternativa que podría sustituir el control químico, principal medida de control, que además de su elevado costo, trae como consecuencia el desarrollo de mecanismos de resistencia en hongos fitopatógenos y problemas de contaminación ambiental y toxicidad, (Escande *et al.* 1999).

Ante este problema, se plantea la necesidad de realizar estudios sobre controladores biológicos efectivos, utilizando cepas antagonistas contra el agente patógeno *Alternaria alternata* (Fr.) de los cítricos, proponiendo una alternativa ecológica frente al uso de

agroquímicos, cambiando así su dependencia por productos naturales entre los agricultores.

El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la actividad metabólica inhibitoria que presentan las cepas antagonistas que posee la subdirección de Control Biológico, SENASA sobre *Alternaria alternata* (Fr.) causante de la mancha parda en cítricos, para lo cual se evaluaron hongos productores de sustancias con propiedades inhibitorias en fermentación líquida y seleccionamos la que presentó una mayor actividad controladora contra *Alternaria alternata* (Fr.) en laboratorio y en campo.

Al evaluar la actividad de sustancias con actividad metabólica inhibitoria se abre la posibilidad de realizar estudios posteriores, con el fin de determinar compuestos activos generados por los hongos que favorezcan el control de muchas enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, que generan tantas pérdidas económicas no solo a nuestro país, sino a nivel mundial.

II.- MARCO TEÓRICO

2.1.- Historia y origen de los cítricos

Los cítricos tienen su origen en Asia oriental, concretamente en la zona que abarca desde la vertiente meridional del Himalaya hasta China meridional, Indochina, Tailandia, Malasia e Indonesia (Davies y Albrigo, 1994). Hoy en día, su cultivo se extiende por la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales que comprendidas entre los paralelos 44 °N y 41 °S (Agustí, 2003).

Las numerosas especies del género *Citrus* provienen de las zonas tropicales y subtropicales de Asia y del archipiélago Malayo; desde allí se distribuyeron a las otras regiones del mundo donde hoy se cultivan cítricos. El área comúnmente asociada a su origen está ubicada al sudeste de Asia, incluyendo el este de Arabia y Filipinas; desde el Himalaya al sur hasta Indonesia. Dentro de esta gran región, el noreste de India y norte de Burma, serían las regiones más importantes, debido a la diversidad de especies encontradas recientemente en la provincia de Yunnan (Centro sur de China).

Los cítricos se cultivan desde épocas muy remotas (más de 4000 años). Sus frutas atrajeron la atención de los pueblos primitivos, que se supone ya las cultivaban mucho tiempo antes de que aparecieran en los países europeos. Se sabe que la apariencia de la fruta y sus flores cautivaron a los primeros viajeros, que no sólo la describieron en sus memorias sino que la llevaron a otras regiones (Agustí, 2003).

Las primeras frutas conocidas en Europa hacia 310 (A.C.) pertenecían al grupo de las cidras (*Citrus medica* L), originario de la región comprendida entre el sur de China e India. Las limas (*C. aurantifolia* Swingle) aparentemente se originaron en el este de la

India. Desde allí fueron difundidas por el mar de Omán. El centro de origen de los limones (*C. limon* Burman), es totalmente desconocido. Se cree que son híbridos de lima y cidra.

La naranja dulce (*C. sinensis* (L.) Osbeck), originaria del sudeste de China, probablemente haya sido llevada a Europa por los romanos. Sin embargo, hay evidencias del cultivo de naranjas antes de la destrucción de Pompeya (ocurrida en el año 79 D.C.), según se observa en un mosaico entre las ruinas de la ciudad. Se sabe con certeza que las naranjas fueron cultivadas por varias centurias en China, antes que los europeos la conocieran y sus referencias se encuentran en manuscritos y documentos muy antiguos.

La naranja agria (*C. aurantium* L.) es originaria del sudeste de Asia (posiblemente India). A partir de su dispersión desde el centro de origen, es poco lo que se conoce sobre la manera en que se han distribuido los cítricos. Desde Asia fueron llevados al norte de África y el sudeste de Europa. Posteriormente fueron traídos a América por los europeos, alrededor del año 1500. La naranja de ombligo Washington se originó en Bahía, Brasil, y desde allí fue llevada a Australia, Florida y California en los EE.UU.

El pummelo (*C. grandis* (L.) Osbeck), llamado también “shaddock”, se originó en el archipiélago de Malasia. Híbridos de estas primeras plantas fueron llevados a Europa y desde allí al Caribe. Probablemente los pomelos verdaderos (*C. paradisi* Macf) se originaron por una mutación o como un híbrido de pummelo en Barbados (Indias Occidentales). A Florida (EE.UU), productor de pomelos más importante del mundo, fueron introducidos desde El Caribe como semillas.

El área de origen de las mandarinas (*C. reticulata* Blanco) probablemente esté ubicada en la región de Indochina y sur de China; desde allí habrían sido llevadas por los primeros viajeros hacia el este de la India. El lugar de producción tradicional de esta especie ha sido Asia; desde allí habrían sido transportadas a Europa mucho después que otras especies de cítricos. Por ejemplo, la mandarina Willowleaf (*C. deliciosa* Tenore) fue llevada desde China, (recién en 1805) a la región del Mediterráneo, donde pasó a ser la especie más importante. Otras especies importantes de mandarinas (*C. reticulata* blanco), fueron conocidas en Europa mucho después.

Una vez en América y desde el Caribe y Brasil (a donde llegaron primero), los cítricos como *Fortunella* y *Poncirus* son también originarios de la China; hoy en día se los puede encontrar en todas las regiones citrícolas del mundo.

La investigación y el mejoramiento de los cítricos se iniciaron en los EE.UU aplicando las teorías de Mendel y Darwin, ellos han sido pioneros, liderando en el desarrollo de tecnología de producción citrícola. Primero California y luego Florida, se transformaron en los principales centros de investigación y producción en todo el mundo. Así aparecieron nuevas variedades creadas por el hombre como los tangelos, los citrange y el limequat.

Las primeras plantaciones comerciales para el consumo en fresco datan de finales del siglo XVIII y se han ido ampliando hasta alcanzar en la actualidad una extensa superficie destinada a su cultivo. Esto ha permitido desarrollar unas técnicas y una cultura específica, basada en la óptima adaptación de este cultivo al entorno agroclimático y en la calidad de las producciones obtenidas (Zaragoza, 1993).

En el Perú, fue en el año 1919 que el Ing. Antonio Graña Reyes, propietario de la Hacienda Huando, plantó por primera vez las naranjas sin semillas “Washington Navel” las cuales, en forma rápida, desplazaron a las criollas. Este desarrollo inicial fue seguido por otros agricultores destacando las haciendas Hualcará, Casuarinas, principalmente y fue detenido durante la Reforma agraria que sufrió nuestro país, entre los años 1968 y el 1978. En este lapso se destruyó la agricultura, que con mucho esfuerzo, se había desarrollado. En la década del noventa es cuando recién se introducen las nuevas variedades sin semilla y se podría decir que es allí cuando se inicia la citricultura moderna en el país. En la actualidad, los cítricos son producidos en zonas subtropicales y tropicales, pero sus frutas son parte de la vida de cada día de millones de personas alrededor del mundo.

2.1.1.- Taxonomía y morfología

Los cítricos pertenecen a la familia de las rutáceas, con los géneros *Fortunella*, *Poncirus* y *Citrus*, siendo esta última la principal especie cultivada. La familia Rutaceae es reconocida en el Perú por presentar 25 géneros y 76 especies (Brako & Zarucchi, 1993; Ulloa *et al.* 2004), principalmente árboles y arbustos. Siendo el género *Citrus* el más cultivado en el mundo con la siguiente clasificación taxonómica:

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: *Rutaceae*

Subfamilia: *Aurantioidea*

Género: *Citrus*

El género *Citrus* es generalmente dividido en dos subgéneros: *Citrus* y *Papeda*.

2.1.2.- Ecología

Los cítricos pueden desarrollar bien entre las latitudes 40°N y 40°S y hasta 1800 msnm. El rango de temperatura óptima está entre 23 a 30 °C pudiendo soportar temperaturas extremas de 13 a 18 °C. En la costa central del Perú, donde se cultiva cítricos, está comprendido entre los 10° y 40° LS, y alcanzan una latitud no mayor de 350 msnm.

Para el cultivo de los cítricos, más importante que las características físico-químicas del suelo, son las características físico-morfológicas del suelo (Doorembos and Kasam, 1986). Según los autores, estas características son las que gobiernan una gran parte del comportamiento de los árboles en el tiempo. La presencia de materiales gruesos, capas impermeables, profundidad efectiva, etc. tienen mayor influencia en el comportamiento y respuesta del cultivo.

Por otro lado, los cítricos son cultivos sensibles a la salinidad. El cultivo muestra una marcada respuesta negativa en el rendimiento con un aumento de la salinidad (Doorenbos *et al.* 1992). En general la salinidad afecta al crecimiento de las plantas mediante tres mecanismos relacionados entre sí pero distintos:

- Alteraciones hídricas producidas por sus efectos osmóticos sobre la disponibilidad de agua.
- Acumulación de iones tóxicos.
- Interferencias con la absorción de elementos nutritivos esenciales, que provocan desequilibrios en el balance de elementos minerales.

Los árboles de cítricos son “siempre verdes” y por lo tanto transpiran todo el año. El requerimiento de agua está en función de: clima, suelo, cobertura, control de maleza, especie y patrón.

El factor limitante es la temperatura mínima, ya que no tolera las inferiores a 3 °C; pues la temperatura determina el desarrollo vegetativo, floración, cuajado y calidad de los frutos. Las temperaturas altas constantes mantienen altos niveles de clorofilas y su color es persistentemente verde.

La calidad de agua de riego independiente de la fuente (superficial o subterránea), es un término que se utiliza para indicar la conveniencia o limitación del empleo del agua con fines de riego para los cultivos, para cuya determinación generalmente se toman las características químicas. La acidez o alcalinidad del pH de riego, es una limitante especialmente en el fertirriego, ya que hay peligro que se presenten precipitados de calcio y magnesio o de contribuir a que se incremente el pH del suelo a niveles en que los nutrientes no puedan aprovecharse, este peligro se presenta con pH mayores que 8.0. Finalmente dentro de las características del suelo, se consideran las sustancias que llevan en suspensión como: tierra (arena, arcilla, limo) y materia orgánica. Los materiales sólidos de mayor densidad, que el agua contiene, se eliminan por decantación y los materiales orgánicos con la filtración cuando se trata de riego tecnificado.

2.1.3.- Importancia económica

Los cítricos peruanos siguen su continuo ascenso en el mercado internacional al conseguir un valor de 53,5 millones de dólares y un volumen de 64,8 TM durante el período enero-octubre del año 2010. Esta carrera exitosa de los cítricos lo lidera la

mandarina, que alcanzó un valor de 34,4 millones de dólares y realizó embarques por un volumen de 36,6 mil TM. A las exportaciones de mandarina seguirían las correspondientes a Tangelo, y naranja (Ministerio de Agricultura, 2011).

Los principales mercados de destinos de estos productos son el Reino Unido (mandarina Satsuma), seguido de Holanda (mandarina Satsuma y Tangelos), Estados Unidos (Tangelos) y Canadá (mandarina Satsuma y Tangelos). Estos países representan el 85% de los envíos totales de cítricos, y próximamente la exportación de cítricos peruanos al enorme mercado asiático (China).

Cabe destacar que el sector citrícola tiene dos formas principales de comercialización de sus productos. Por un lado existe un mercado que está basado en la comercialización de los productos frescos. Por otro lado, existe un mercado para aquellos bienes que son producto de la transformación industrial de la fruta.

La industria cítrica posee una gran variedad de subproductos. Se trata de una actividad que ha tenido en los últimos años una llamativa dinámica exportadora e interesantes posibilidades de continuar con su expansión permitiendo obtener una serie de productos y subproductos que se destinan a diversos usos:

- Para el consumo humano, los jugos concentrados y cremogenados (triturado de frutas).
- Para el consumo animal, como subproducto del proceso de obtención de jugos cítricos quedan la corteza, membranas, parte de la pulpa y eventualmente las semillas.

- Para la industria farmacéutica de cosméticos y perfumes, los aceites esenciales y saborizantes y las cáscaras deshidratadas; de las que se obtienen pectinas son utilizadas por esta industria.

2.2.- Enfermedades de los cítricos

La mayor parte de las enfermedades son causadas por hongos que atacan aquellas plantas que se encuentran debilitadas por un mal manejo (programas de fertilización inadecuados o ausencia de ellos, heridas, ausencia de riegos, drenaje deficiente, etc.). Es por esto muy importante tomar las medidas necesarias para mantener la planta en condiciones óptimas de desarrollo. Los métodos más económicos para disminuir su incidencia están basados en medidas preventivas, es decir usar patrones y variedades resistentes y/o certificadas, esto es, que se tenga una seguridad razonable de que las plantas no están infectadas. (Ministerio de Agricultura, 2008).

2.2.1.- La enfermedad: “Mancha parda de los cítricos”

Los síntomas de la mancha parda de los cítricos se descubrieron por primera vez en 1903 sobre Mandarina Emperor en Australia, aunque su agente causal no fue identificado hasta 1959 (Kiely, 1964). Actualmente la enfermedad está extendida por las principales áreas citrícolas del mundo, tanto de clima subtropical húmedo como semi-árido, (Timmer *et al.* 2003). “La mancha parda de los cítricos” es una enfermedad causada por el hongo *Alternaria alternata* (Fr.), que afecta a las mandarinas, en especial a la variedad Dancy, tangelos Minneola, Murcotts y en menor grado tangelos Orlando, Novas, Lee, y Sunbursts. Esta enfermedad afecta a los frutos, hojas y brotes de las variedades susceptibles. Las hojas jóvenes son muy susceptibles a la enfermedad y es frecuente la aparición sobre ellas de áreas necróticas de gran tamaño. En muchos casos, estas lesiones avanzan rápidamente siguiendo las nervaduras de las hojas. Las

lesiones suelen presentar un halo clorótico a su alrededor y muchas de las hojas afectadas caen prematuramente. Los tejidos foliares van haciéndose resistentes a medida que van completando su desarrollo. Las lesiones dejan de crecer en tamaño, pero confieren un aspecto asimétrico y deformado a las hojas (Vicent, 2003).

Los tallos de los brotes pueden presentar también lesiones necróticas de 1-10 mm de diámetro. En casos de infecciones muy severas, los brotes pueden incluso llegar a necrosarse por completo. Los frutos afectados por la mancha parda presentan depresiones necróticas de tamaño variable y pústulas suberosas en la corteza. Estas lesiones quedan restringidas a la corteza y no afectan a los frutos recién cuajados, muchos de ellos sufren una abscisión prematura (Vicent, 2003).

2.2.2.- Taxonomía y morfología

A. alternata es un hongo filamentoso con conidióforos simples, tabicados en cuyo extremo se forman unos conidios muriformes, de color pardo, con septos transversales y verticales de disposición irregular, se les conoce como dictiosporas. Por gemación de la célula apical se genera un nuevo conidio, formándose largas cadenas de 10 o más conidios a partir de conidióforos cortos. La ramificación de los conidios surge de conidióforos secundarios desde células conidiales basales o apicales, en relación 1:1, dando un aspecto abierto, (Andersen *et al.* 2001). Las cadenas aparecen en los cultivos como manojos densos y aislados, (Roberts *et al.* 2000). Presenta colonias de crecimiento rápido (tres o cuatro días), vellosas, al principio de color gris, después el centro se oscurece (tonos negros más o menos intensos) pero los bordes siguen grisáceos. Reverso de color negro, (Andersen *et al.* 2001).

2.2.3.- Ecología

A. alternata esporula sobre las lesiones de hojas, brotes y frutos. No obstante, las lesiones foliares viejas están consideradas como la principal fuente de inóculo, (Reis *et al.* 2006). La producción de conidios es máxima a partir del 85% de humedad relativa, no siendo necesaria la presencia de agua líquida sobre la planta. Bajo condiciones adecuadas, la producción de conidios (periodo infeccioso) se da durante los 10 – 40 días después de la aparición de los primeros síntomas. La capacidad de esporulación del hongo es mayor en las variedades más susceptibles, (Reis *et al.* 2006).

La caída de hojas al suelo se descomponen rápidamente y la esporulación de *A. alternata* sobre ellas es prácticamente nula a partir de los 8 -12 días después de la abscisión, (Reis *et al.* 2006). Nuestro clima es menos lluvioso y es posible que las hojas tarden más en descomponerse, por lo que podrían ser una fuente potencial de inóculo durante más tiempo.

Los conidios de *A. alternata* se liberan por bajadas bruscas de humedad relativa o por la acción de la lluvia. Su diseminación se da principalmente a través de corrientes de aire y también por salpicaduras de lluvia. Respecto a la evolución estacional del inóculo, en trabajos realizados en Florida se han constatado que las máximas concentraciones de conidios en el aire se producen como consecuencia de las infecciones foliares, (Timmer *et al.* 2000).

Los conidios de *A. alternata* comienzan a emitir la toxina ACT en el momento de su germinación, por lo que el período que transcurre entre el inicio de la infección y la aparición de los primeros síntomas (período de incubación) es de tan solo 16 – 36 horas. La temperatura óptima de infección de *A. alternata* se sitúa entre los 23 – 27 °C

junto con 12 a 36 horas de humectación (película de agua sobre la planta). Cuanto menor es la temperatura, mayor es el número de humectación necesario para la infección, según Canihos *et al.* (1999). El agua necesaria para la infección puede aparecer en forma de lluvia, su efecto en la infección viene determinado más por su frecuencia que por su duración (Timmer *et al.* 2000).

2.2.4.- Daño económico

Alternaria alternata (Fr.), agente causal de la mancha parda en cítricos, ampliamente distribuido en las principales zonas citrícolas del mundo, ocasiona grandes pérdidas económicas tanto en los cítricos de consumo directo como en las variedades destinadas como insumos de productos elaborados, especialmente en zonas con climas templados y húmedos durante la época de brote. Adicionalmente, ocurren infecciones latentes, las que tienen importancia como fuente de inóculo para el posterior desarrollo de esta enfermedad (Reis *et al.* 2006).

Los daños de “la mancha parda” afectan principalmente a la calidad externa de la cosecha, aunque la caída de frutos puede reducir también el rendimiento productivo de los árboles de cítricos. En parcelas muy afectadas se han descrito reducciones de producción superiores al 50% e incidencias de hasta el 95% de frutos afectados. Por otra parte, las defoliaciones durante la brotación de primavera pueden afectar también a la productividad de los árboles (Vilches - Martínez, 2004).

2.2.5.- Alternativas de control y medidas de combate

Dentro del control cultural se pueden mencionar varios métodos preventivos que son de gran importancia. Cabe destacar que es fundamental que la profundidad de plantación sea la adecuada, evitando condiciones de mal drenaje y escasa aireación. Los árboles

deben podarse adecuadamente para evitar la formación de copas excesivamente densas. Para evitar el exceso de tejido susceptible es recomendable reducir los riesgos y la fertilización nitrogenada durante las épocas de brotación (Palti, 1981; Timmer, 2003). Ante la presencia del patógeno, enterrar o retirar de la parcela las hojas afectadas caídas al suelo podría considerarse a priori como una medida de control basada en la reducción del inóculo, esta práctica podría estar justificada en parcelas pocas afectadas donde la enfermedad todavía no es endémica.

Es importante indicar que las prácticas culturales son muy efectivas como complemento al control con fungicidas, (Reis *et al.* 2006). Aunque algunas ayudan notablemente a reducir la severidad de la enfermedad, el control económico de la mancha marrón de las mandarinas está basado en la aplicación de fungicidas, siendo principalmente preventivos. Esto implica que el fungicida debe estar presente sobre la planta antes de la infección.

Dentro del control químico, los fungicidas más utilizados son: Mancozeb y compuestos cúpricos, como caldo Bordelés, hidróxido cúprico, oxicloruro de cobre y óxido cuproso desde dos semanas antes de floración a brotes jóvenes al existir condiciones de humedad y frío moderado, reducen la incidencia del patógeno (Lubbe, 2001).

2.3.- Control biológico de enfermedades

Baker y Cook definen el control biológico como la reducción de la densidad del inóculo o actividad productora de enfermedad de un patógeno o parásito en su estado activo o latente, por uno o más organismos antagónicos, en forma natural o por manejo de habitante, hospedante o de los propios microorganismos. En un sentido amplio y según la definición de los mismos autores, el control biológico involucraría todas aquellas

prácticas tendientes a disminuir las incidencias de indeseables excluyendo el control químico. El control biológico en un sentido más restringido de hongos, implica el uso de microorganismos antagonistas que interfieren en la supervivencia de patógenos o en el desarrollo de actividades determinantes de enfermedad o en el control de plantas o malezas indeseables (Agrios, 1998).

Según Garret (1965), el control biológico es definido como cualquier condición o práctica por medio de la cual la supervivencia o actividad de un patógeno se reduce a través de la mediación de cualquier organismo, excepto el hombre, con disminución de la incidencia de la enfermedad. Para ello, es necesario conocer y entender los sistemas de cultivo, la epidemiología de la enfermedad, la biología, ecología y dinámica de población de los antagonistas, definidos como agentes biológicos capaces de interferir en el ciclo biológico de los patógenos de plantas (Parkinson y Waid, 1960).

El control biológico ofrece ventajas por su bajo costo, no contamina el ambiente, y no presenta problemas de residuos, pero los resultados disponibles han sido obtenidos mayormente *in vitro* y bajo condiciones controladas. No obstante se van incrementando los trabajos de investigación en los diferentes países del mundo. Actualmente el control biológico constituye en uno de los grandes retos de nuestros tiempos (FAO, 1990).

2.3.1.- Los hongos como agentes de control biológico

El control de hongos fitopatógenos utilizando microorganismos antagónicos, como se ha definido en su forma clásica se basa en la acción antifúngica de bacterias, hongos, y actinomicetos, etc. provenientes del suelo conocidos con el nombre de hiperparásitos o micoparásitos. Ej: *Trichoderma* spp en *Sclerotium rolfsii*, *S. cepivorum*, *Verticilium dahliae* y *Rhizoctonia solani* (Ahmad, 1987; Baker, 1984; Chet, 1980, Strashnov, 1985).

En el control biológico, se utilizan las esporas o los filtrados de cultivos de hongos que actúan por medio de productos metabólicos que ejercen acción sobre la pared celular, membrana y ácidos nucleicos de sus hospedadores o por micoparasitismo matando las estructuras invadidas directamente, reduciendo de esta manera la concentración de esporas o de la densidad poblacional; por consiguiente, el ataque de muchos hongos fitopatógenos de importancia económica (Elad y Katan, 1980).

El control de enfermedades causada por hongos, como en el presente trabajo ha iniciado la posibilidad de su empleo mediante estudios *in vitro* y en el campo para el control de *Alternaria alternata* causante de la mancha parda en cítricos, utilizando la cepa *Trichoderma R6*.

2.3.2.- Microorganismos antagónicos

El mecanismo por el que los microorganismos antagónicos afectan a las poblaciones de patógenos no siempre es claro, pero en general se atribuyen a uno de los cuatro efectos:

- a) Parasitismo directo y muerte del patógeno.
- b) Competencia con el patógeno por el alimento.
- c) Efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista.
- d) Efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por sustancias volátiles como el etileno, liberadas por las actividades metabólicas del organismo antagonista.

Entre los hongos antagonistas más estudiados se tiene *Trichoderma* spp. que ejerce un biocontrol sobre muchas especies de hongos fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii*, *S. cepivorum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* y

muchos otros (Hadar *et al*, 1979). Dentro de los hongos micoparásitos, se encuentra *Trichoderma harzianum*, que parasita el micelio de *Sclerotium* sp, inhibe el crecimiento de muchos hongos, como *Pythium* sp, *Fusarium* sp, *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*, y reduce la magnitud de las enfermedades causadas por la mayoría de estos patógenos. Otros hongos micoparásitos comunes como *Lateisaria arvalis*, un micoparásito y antagonista de *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium* sp; así mismo, *Sporidesmium sclerotivorum*, *Gliocadium virens*, y *Coniothorium minitans* son parásitos y antagonistas destructores de *Sclerotinia sclerotium* y controla eficazmente varias de las enfermedades que causa *Sclerotinia* sp, (Fravel, 1988).

2.3.3.- *Trichoderma* spp

Trichoderma spp, probablemente sea el hongo beneficioso más versátil y polifacético que abunda en los suelos. No se conoce que dicho microorganismo sea patógeno de ninguna planta; sin embargo, es capaz de parasitar, controlar y destruir muchos hongos, nemátodos y otros fitopatógenos, que atacan y destruyen muchos cultivos; debido a ello, muchos investigadores le llaman el hongo hiperparásito. Este hongo que se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, se presenta en diferentes zonas y hábitats, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, especialmente en aquellos que son atacados por otros hongos. Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos le confiere la posibilidad de ser utilizado en diferentes suelos, cultivos, climas y procesos tecnológicos (Papavizas, 1985; Fravel, 1988; Benhamou y Chet, 1997). Así mismo, tiene diversas ventajas como agente de control biológico, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, también produce una gran cantidad de enzimas, inducibles con la presencia de hongos fitopatógenos. Dentro de los organismos utilizados para la biodegradación, también se ha estudiado en éste

su capacidad de degradar pesticidas organoclorados, clorofenoles, y otros insecticidas como DDT, endosulfán, pentacloronitrobenceno, aldrin y dieldrin, herbicidas como trifluralin y glifosato. Este hongo posee enzimas tales como celulasas, hemicelulasas y xylanases que ayudan a la degradación inicial del material vegetal y por último enzimas de mayor especialización que contribuyen a la simplificación de moléculas complejas como son las de biopesticidas (Cenicafé, 2012).

Trichoderma sp se comporta como saprofita en la rizósfera, siendo capaz de destruir residuos de plantas infectadas por patógenos. Se considera que su acción es antagonista, siendo capaz de sacar el mejor provecho por su alta adaptación al medio y por competir por el sustrato y espacio. Actúa por medio de una combinación de competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas y micoparasitismo (Yedidia *et al.* 1999; Stefanova *et al.* 1995; Yedidia *et al.* 2000; Howell *et al.* 2000).

2.3.4.- Taxonomía y morfología de *Trichoderma* spp

El género *Trichoderma* lo propuso Person en 1794 con 4 especies, Rifai en 1969 agrega 9 especies más; posteriormente, Bisset (1984, 1991a, 1991b, 1991,c) eleva algunas de las especies agregadas con Rifai a rango de sección, agrupándolas en 4 secciones: Longibrachiatum, Pachybasium, Trichoderma y Hypocreanum. Actualmente se tiene alrededor de 75 especies descritas (Samuels, 1996; Kuhls *et al.*, 1997). Considerando las aportaciones de Rossman, Samuels, Rogerson y Lowen (1999) y las indicaciones de G.J. Samuels, la clasificación taxonómica del género *Trichoderma*, podría ser de la siguiente manera:

Reino: Mycetae (fungi)
División: Eumycota
Subdivisión: Ascomycotina
Clase: Euascomycetes
Orden: Hypocreales
Familia: Hypocraceae
Género: *Trichoderma*

Las características del género son: conidióforo hialino muy ramificado no verticilado, fiálides individuales o en grupos, conidios hialinos de 1 célula, ovoides, nacidos en pequeños racimos terminales (Barnett y Hunter, 1972). Asimismo, tiene conidios de glboso y subgloboso, elipsoidal u oblongo menor de 5 μm de largo y ancho, de color verde oscuro profundo cercano a gris pasando por verde y verde amarillo. Los conidióforos no están bien definidos y los conidios tienden a acumularse dentro de masas pulvinadas, los agregados formados de hifas entrelazadas produciendo fiálides. Las clamidosporas tienden a ser globosas a subglobosas, terminales o intercalares de tono verde y menores a 15 μm de diámetro (Samuels, 1996).

La colonia en medio de cultivo con agar crece rápido y los conidios se forman rápido y abundantemente en forma de polvillo no hay micelio aéreo y la pigmentación es típica en tonos verdes, verde-amarillos; algunos cultivos presentan un olor parecido al coco por Samuels, (1996). El pH es importante para manipular tanto el crecimiento, como la esporulación y la mayor longevidad se obtiene en un medio con pH de 6,0 y permanecen viables las esporas en un período de 45 días en almacén. Bajo condiciones de campo requiere humedad relativa alta para sobrevivir más tiempo (Agosin, Volpe, Muñoz, San Martín y Crawford, 1997).

2.4.- Metabolismo secundario

Los metabolitos secundarios son parte de los compuestos más importantes que los organismos producen principalmente en la fase estacionaria de crecimiento, como por ejemplo algunos antibióticos y enzimas. Estos están ligados fuertemente a las condiciones de cultivo y algunos de ellos han tenido gran importancia a nivel industrial (Madigan *et al.*, 1991). Adicionalmente, dentro del reservorio de productos naturales, existen varios metabolitos fúngicos que han demostrado su utilidad en fitoprotección de cultivos, debido tanto a sus efectos directos sobre los fitopatógenos, como a los efectos indirectos sobre la planta. Esto es debido a que, estos pueden inhibir el desarrollo de estructuras de infección y penetración del patógeno, o actuar como inductores de respuestas de defensa en el huésped, protegiendo en ambos casos a la planta de los efectos deletéreos de los hongos fitopatógenos.

2.4.1.- Hongos productores de antifúngicos

En el control biológico, se utiliza las esporas o los filtrados de cultivos que actúan por medio de productos metabólicos que ejercen acción sobre la pared celular, membrana y ácidos nucleicos de sus hospederos o por micoparasitismo matando las estructuras invadidas directamente, reduciendo de esta manera la concentración de esporas o la densidad poblacional, y por ende el ataque de muchos hongos fitopatógenos de importancia económica (Elad and Katan, 1980).

El control de hongos fitopatógenos utilizando microorganismos antagónicos, como se ha definido en su forma clásica se basa en la acción antifúngica de bacterias, hongos y actinomicetos, etc., provenientes del suelo, conocidos con el nombre de hiperparásitos o micoparásitos. Ejemplo: *Trichoderma* spp en *Sclerotium rolfsii*, *S. cepivorum*,

Verticillium dahliae, *R. solani*, (Ahmad, 1987; Baker, 1984; Chet, 1980, Strashnov, 1985).

2.4.2- Importancia del metabolismo secundario

Muchos de los metabolitos fúngicos utilizados como agentes de biocontrol de microorganismos fitopatógenos, presentan diferentes modos de acción específicos o no específicos, y comprenden tanto agentes líticos, enzimas, compuestos volátiles y otras sustancias tóxicas, siendo considerados como mecanismos de antibiosis y agrupados dentro de estos fenómenos de antagonismo como antibióticos, sustancias volátiles y enzimas (Fravel *et al.* 1988). Algunas investigaciones realizadas durante la década de los 80's, relacionan el empleo de diferentes extractos de fermentación fúngica con la inhibición de algunos fitopatógenos. Otros mencionan que el extracto del medio de cultivo de *Trichoderma harzianum* resultó en una inhibición de la pudrición blanca ocasionada por *S. cepivorum*. (Papavizas *et al.* 1982). Se encontró una sustancia producida por *Scytalidium* sp que inhibía a *Poria carbonica* (Poveda, 2006). Posteriormente, se aisló un metabolito del medio de cultivo de *Talaromyces flavus*, que destruía los esclerocios de *Verticillium dahliae* (Fravel *et al.* 1988).

Wilson y Wisniewski (1994), también exponen una revisión de diversas investigaciones, de donde se aislaron algunos metabolitos bioactivos de cultivos líquidos, principalmente de especies de *Trichoderma* sp, varios compuestos de estructura 6-pentil- α -pirona, siendo de este grupo, el 6-amil- α -pirona el más común y potente *in vitro* e *in vivo*. Otras especies como *T. lignorum* y *T. viride* producen trichodermina, que inhibe no solo a hongos filamentosos sino también a *Candida albicans*. Otros metabolitos fúngicos derivados de este género, son las koninginas, aisladas de *T. koningi* que produce Koningina A, y de *T. harzianum* que sintetiza tanto la Koninginas Ay B, así como dos

nuevas estructuras butenolidas, estas últimas con actividad frente a *Gaeumannomyces graminis*, un patógeno de cereales (Wilson y Wisniewski, 1994).

2.4.3- Pigmentos

Los pigmentos de los hongos no son esenciales para el crecimiento y desarrollo del organismo, están asociados con la esporulación, principalmente; su importancia en el ciclo de vida es en darles a las esporas resistencia ante las condiciones ambientales. Los dos grupos principales: melaninas fúngicas, carotenoides (Csiktunádi *et al.*, 2002).

2.5.- Efecto de agroquímicos sobre la microbiología de la superficie aérea de las plantas

Los agroquímicos utilizados en el control de plagas pueden reducir las poblaciones de microorganismos en el filoplano, microambiente de la superficie de la hoja (Andrews y Kenerly, 1978; Hislop, 1976).

Por lo tanto, un programa de control integrado de enfermedades debe considerar el espectro de acción del fungicida y bactericida para que pueda ser útil y compatible con otros factores de manejo (Blakeman y Fokkema, 1982).

El control de hongos fitopatógenos actualmente se realiza con sustancias de origen químico: los plaguicidas; los cuales son aplicados al follaje, a las semillas y al suelo. Los mayores problemas que ocasionan su uso son:

1. Destrucción de la capa de ozono.
2. Contaminación del ambiente, al acumularse los residuos tóxicos en el agua, suelo, plantas y animales.

3. Peligros para la salud de los agricultores cuando se aplican sin ningún tipo de protección y precaución.
4. Enfermedades en humanos y animales cuando se consumen productos vegetales contaminados con residuos tóxicos que pueden producir incluso la muerte.
5. Eliminación de microorganismos benéficos, muchas veces rompiendo el equilibrio ecológico.
6. Producir resistencia por parte de los patógenos y conversión en plaga a aquellos no considerados como tales.

Esta situación genera la búsqueda de alternativas al uso de los plaguicidas químicos, por lo que la mirada de los investigadores se dirige hacia los microorganismos, para ser usados como agentes de control biológico, en el control de patógenos de plantas.

2.5.1.- Efecto de fungicidas

Los fungicidas de amplio espectro tales como el Captan y los Ditiocarbamatos inhiben fuertemente el crecimiento de hongos saprófitos, sin embargo, las bacterias por lo general no son afectadas (Fokkema, 1981).

Se ha observado que los fungicidas a base de cobre usado para el control de *Clasterosporium corpophilum* en Australia pueden causar la intensificación de la enfermedad debido a la disminución de las poblaciones antagonistas superficiales. Por el contrario, Trimedorf tuvo un efecto relativamente específico y menor sobre la población no objetivo, a diferencia del Zineb y Benomyl los cuales inhiben muchas levaduras y hongos filamentosos (Dickinson y Wallace, 1976). Dichlone, Ferbam y Thiram dieron una buena protección contra *Botrytis cinerea*, pero al compararse con las plantas de testigos, reducen las poblaciones de los hongos saprófitos, lo cual disminuye

el control natural de este hongo (Newhook, 1978). Por otro lado, Captafol al compararse con Benomyl y Trimedorf redujo considerablemente la microflora en cereales. (Kookana, Rai, and Simpson, 2000)

El espectro fungitóxico de los fungicidas sistémicos benzimidazoles tales como Benomyl y Tiabendazol han demostrado efectos similares, controlando patógenos tan importantes como *Alternaria* sp, *Drechslera* sp, *Curvularia* sp, y *Sthempylum* sp, además de ciertas levaduras saprófitos comunes en las plantas (Edgington y Barron, 1971). Los patógenos como *Phoma* sp, *Drechslera* sp, y *Alternaria* sp, los cuales son susceptibles a Benomyl, pueden ser antagonizados por saprófitos comunes (Warren, 1972; Pace y Campbell, 1974; Fokkema, 1973).

Por el contrario, el Ethirimol y Dimethirimol dado sus características se aproximan a fungicidas ideales, ya que son extremadamente efectivos contra patógenos causantes de mildiu y no afectan al resto de saprófitos y parásitos (Dickinson, 1976).

Aunque algunas medidas culturales ayudan a reducir notablemente la severidad de la enfermedad, el control económico de la mancha parda de los cítricos está basado en la aplicación de fungicidas. Las aplicaciones fungicidas deben basarse exclusivamente en el uso de Mancozeb y compuestos cúpricos, como caldo bordelés, hidróxido cúprico, oxiclورو de cobre y óxido cuproso, (Vicent *et al.* 2007).

Debido a la rápida acción de la toxina, el período de incubación de esta enfermedad es tan solo de 16 horas – 36 horas. Con este corto intervalo de tiempo, las aplicaciones curativas tienen pocas posibilidades de actuar sobre las infecciones asintomáticas, por lo que el control ha de ser necesariamente preventivo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

4.1.- Localización del área de estudio

El trabajo de investigación se realizó en su primera etapa en la unidad de Entomopatógenos y Laboratorio de Antagonistas de la Subdirección de control biológico de SENASA, Ate – Vitarte. El trabajo de campo se realizó en el fundo San Hipólito, en el distrito de San Luis, Cañete.

4.2.-Selección de hongos con propiedades antagonicas sobre *Alternaria alternata*.

Cepas de hongos antagonistas: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma viride* endófito 247, *Trichoderma R6*, *Pochonia chlamydosporia*, y *Clonostachys rosea*, proporcionados por el laboratorio de hongos entomopatógenos y antagonistas de la subdirección de control biológico del SENASA, Ate – Vitarte. Cepa patogénica *Altenaria alternata*, aislada de hojas infectadas de cítricos del fundo San Hipólito, en el distrito de San Luis, Cañete.

4.2.1.- Activación de las cepas antagonistas y fitopatógena.

Para la reactivación de las cepas antagonistas cuyos extractos bioactivos que se evaluaron corresponden al de los hongos filamentosos del cepario del SCB de SENASA de Ate – Vitarte, y el hongo fitopatógeno aislado, que se encontraban conservadas en tubos de agar papa dextrosa (APD) se sembraron en agar Sabouraud dejándose incubar a 28 °C en oscuridad hasta el desarrollo de la colonia (Cañedo, 2004. En: Manual de Laboratorio de Entomopatógenos del CIP).

4.2.2.-Preparación de la suspensión de conidios de los hongos.

Los hongos reactivados fueron nuevamente sembrados en placas con medio APD, se adicionaron 10 mL de una solución de Tween 80 al 0,1% (w/v) en agua destilada estéril (ADE) y se removieron los conidios mediante desprendimiento usando un asa de siembra. La suspensión de conidios obtenida se ubicó en un tubo estéril y se agitó en el vórtex durante 30 segundos. A partir de esta suspensión madre se realizaron diluciones seriadas usando una solución de Tween 80 al 0,1% (w/v) en ADE y se realizó un recuento de conidios en cámara de Neubauer (CNB) para ajustar la concentración de la suspensión a 10^7 conidios/mL (Seeley; and Van Demark, 1973).

4.2.3.- Evaluación de la actividad antagónica de los hongos frente a *A. alternata*.

Se sembró por puntura *A. alternata* de una suspensión de conidios en un extremo de una placa con APD de 9.0 cm de diámetro, a 2.0 cm del borde; y en el otro extremo, el hongo antagonista evaluados a partir de una suspensión de conidios de 5 días de crecimiento separados a una distancia de 5.0 cm. Se prepararon cinco repeticiones por cada placa de enfrentamiento más dos testigos correspondientes al patógeno y el hongo antagonista (Quiroz – Sarmiento *et al.* 2008).

4.2.3.1.- Lectura de ensayos: Todas las placas se incubaron a 28 °C en oscuridad, realizándose las observaciones cada 24 horas midiendo el radio de crecimiento del patógeno tanto de los tratamientos como de los testigos hasta las 120 horas para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento del radio (PICR). Se evaluaron los criterios de micoparasitismo; sitio de contacto entre los dos hongos para determinar el tipo o tipos de interacción hifal presentes (penetración, vacuolización, lisis, y/o enrollamiento), y competencia por el sustrato. Para evaluar la interacción entre los dos hongos se tomó una muestra de la zona de interacción de ambos hongos con tres

repeticiones, las cuales se realizaron a las 120 horas haciéndose las observaciones al microscopio de luz con un aumento de 63x. Se seleccionó el hongo antagonista con mayor efecto biocontrolador.

4.3.- Producción de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria a partir de cultivos líquidos en caldo papa dextrosa (CPD).

Para la producción de los metabolitos secundarios con actividad inhibitoria se trabajó con placas de 5 días de crecimiento de la cepa antagonista seleccionada. A partir de estas placas con el hongo crecido, se aplicó el procedimiento anteriormente mencionado para la obtención de la suspensión de conidios (preinóculo). Posteriormente en cinco Erlenmeyers de 500 mL, se inoculó 1 mL de una suspensión de conidios/ mL en 100 mL de caldo PD para ajustar una la concentración a $1,0 \times 10^7$ conidios/mL y pH 6.0. Luego, se incubó a 25° C +/- 2 °C y con agitación mecánica de 160 rpm evaluando uno de ellos a los 8, 10, 14, 18 y 22 días.

Para cada uno de los días de evaluación, se hizo pasar uno de los medios a través de dos tamices con poros de 850 y 250 μm de diámetro y papel filtro Watman N° 2 estéril, con el objetivo de retener la fracción celular y remanentes del medio obtenidas de la fermentación y así, recolectar la solución acuosa donde se encuentran los productos extracelulares del metabolismo. Luego, se realizó una centrifugación del primer filtrado a 10 000 rpm x 15 minutos a 4 °C recuperándose el sobrenadante. Finalmente, el sobrenadante pasó a través de membranas de filtro de milipore de 0.22 μm obteniendo el filtrado que contenga los metabolitos producidos por el hongo (Highley, 1997; Madi *et al.* 1997).

4.3.1- Evaluación del filtrado

Se evaluó el filtrado conteniendo los metabolitos de inhibición de los 8, 10, 14, 18 y 22 días de la cepa seleccionada. Un volumen de 50 mL del filtrado se mezcló con APD y se sirvió en placas de Petri. Al medio APD incorporado con el filtrado se le inoculó *A. alternata* por puntura a partir de una placa de 10 días de crecimiento, se incubó a 28 °C, por 10 días. Se realizaron 5 repeticiones más un testigo. Para el testigo, el medio APD se mezcló con ADE.

4.4.- Medición de la actividad inhibitoria del crecimiento del fitopatógeno.

Se realizó las mediciones en las cuatro orientaciones cardinales del crecimiento de la colonia con la ayuda de una regla milimetrada desde el centro de siembra al extremo de la colonia.

4.5.- Determinación del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR).

Las lecturas realizadas en las evaluaciones sobre el crecimiento del micelio tanto de la placa del testigo y del tratamiento, fueron transformados en PICR mediante la fórmula:

$$\boxed{[(A1 - A2) \times 100] / A1} ; \text{(Worasatit et al., 1994).}$$

Donde:

A1: radio de la colonia *A. alternata* del control.

A2: radio de la colonia *A. alternata* tratada con el filtrado.

Tabla 1. Escala de antagonismo.

Grado	PICR	Porcentaje de cubrimiento del antagonista de la superficie del medio
1	El antagonista inhibe en un 100% el micelio del fitopatógeno.	100%
2	El antagonista inhibe en un 75% el micelio del fitopatógeno.	75%
3	El antagonista inhibe en un 50% el micelio del fitopatógeno.	50%
4	El antagonista inhibe en un 25% el micelio del fitopatógeno.	25%
5	El antagonista no inhibe el micelio del fitopatógeno.	0%

Una especie evaluada se considera antagonista contra el patógeno si el promedio es ≤ 3 . A un tratamiento que obtenga un promedio entre 4 ó 5 no se le asigna clasificación (Royse y Ries, 1978).

4.6.- Protocolo del bioensayo en campo

Determinada la actividad inhibitoria de los filtrados producido por la cepa seleccionada se procedió a la evaluación en campo.

4.6.1.- Localización

El experimento se desarrolló en el fundo San Hipólito ubicado en el distrito de San Luis, provincia de Cañete.

4.6.2.- Establecimiento de la zona experimental

Se agruparon 20 plantas al azar en tres grupos, ubicados en distintas parcelas linealmente, en un área determinada localizada en los extremos laterales del campo. De cada grupo se seleccionó al azar 6 plantas para su estudio. Considerando el

experimento completamente al azar se realizaron tres tratamientos con seis repeticiones. Se tomó como testigo del ensayo el grupo tratado con fungicidas químicos.

4.6.3.- Factor en estudio

1) T1 = Tratamiento de principio activo de cepa seleccionada en forma líquida.

2) T2 = Tratamiento de conidios de cepa seleccionada en forma sólida (arroz).

3) T3 = Tratamiento con fungicidas químicos: Mancozeb + Captan (testigo).

1) Dosis de cada producto. Se trabajo con volúmenes y concentraciones iguales (5 mL del principio activo, concentración de conidios 10^6).

Tabla 2. Determinación de tratamientos aplicados para el control de “la mancha parda de los cítricos”.

TRATAMIENTO	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
1	T1	Filtrado con metabolitos
2	T2	Conidios en sustrato arroz
3	T3	Fungicida químico

El número de repeticiones por tratamiento fueron 6, dando un total de 18 unidades experimentales.

4.6.4.- Unidades de observación

De las 6 plantas por cada tratamiento se observaron y evaluaron el grado de incidencia de hojas afectadas por el fitopatógeno en tres niveles: Superior medio e inferior, para tener la posibilidad de observar la incidencia y severidad de la enfermedad. En cada planta se tomaron al azar un total de 6 hojas: tercio superior (1), tercio medio: en los

puntos norte, sur, este y oeste (4), y tercio inferior (1). Un punto importante de la evaluación de la enfermedad fue que se realizó de manera directa en el campo.

4.6.5.- Aplicación de cada tratamiento al cultivo de cítrico.

La aplicación de los fungicidas se utilizó en forma curativa en niveles bajos de la enfermedad para permitir evaluar el grado de incidencia, severidad y eficiencia del control de los productos. Las evaluaciones de incidencia, severidad y eficiencia se realizaron cada 15 días, en las unidades de observación por cada unidad experimental de acuerdo a las recomendaciones por Villarroel (2000).

4.6.6.- Determinación de la incidencia de la enfermedad.

Cada bloque consiste en 20 árboles distribuidos linealmente de tal manera que para la evaluación de la incidencia se consideró seis muestreos de los 20 árboles, distribuidos en 3 bloques experimentales, que constituyen un total de 18 unidades de observación de la parcela, mediante cuantificación de muestras según la fórmula propuesta por French y Herbert (1998). Cada unidad representa un árbol, de él se evaluaron las hojas mediante su cuantificación por unidad experimental (plantas).

La determinación de la incidencia de la enfermedad se realizó según la fórmula propuesta por French y Herbert (1998), mediante la cuantificación de hojas por unidad experimental (plantas).

$$I = [NPE \times 100] / TPO$$

Donde:

I = Incidencia (%).

NPE = Número de hojas enfermas.

TPO = Total de hojas observadas (sanas + enfermas).

4.6.7.- Determinación de la severidad de la enfermedad.

El porcentaje de severidad de la enfermedad se evaluó usando la escala mencionada por Horsfall y Barratt.

Tabla 3. Escala de Horsfall- Barrat para evaluar la mancha foliar de cítricos.

Grado	Área foliar afectada
1	0% (hoja sana)
2	1 a 25% de la hoja sana afectada
3	26 a 50% de la hoja sana afectada
4	51 a 75% de la hoja sana afectada
5	76 a 100% de la hoja sana afectada

4.6.8.- Determinación de la eficiencia de los productos.

La determinación de la eficiencia de los productos se realizó mediante la fórmula de Henderson y Tilton (1955), donde las evaluaciones de eficiencia se realizaron después de 48 horas de la aplicación, según las recomendaciones de Villarroel (2000).

$$E = [1 - Td \times tr.a / Ta \times tr.d] \times 100$$

Donde:

E = Eficiencia del producto.

Tr.a = Lectura del tratamiento antes de la aplicación.

Tr.d = Lectura del tratamiento después de la aplicación.

Ta = Lectura del testigo antes de la aplicación.

Td = Lectura del testigo después de la aplicación.

4.7.- Análisis estadístico

En la evaluación de la capacidad antagonista y la actividad inhibitoria de los filtrados sobre *A. alternata* a través de los métodos de cultivos duales e incorporación del filtrado en placas respectivamente, se determinó a través del Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. El análisis de la severidad, medida con el apoyo de la escala de Horsfall y Barratt, se efectuó a través del Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

IV.- RESULTADOS

5.1.- Selección de cepas de hongos con mayor propiedad antagonica sobre *Alternaria alternata*.

Los resultados de la evaluación del PICR (Tabla 4) a las 120 horas muestran que todas las cepas antagonistas evaluadas frente a *A. alternata* presentaron un efecto inhibitorio de acuerdo a la clasificación de antagonismo de Royse y Ries, 1978. El hongo antagonista ha crecido sobre el patógeno y actúa sobre él por diferentes mecanismos de acción: antibiosis, micoparasitismo directo o penetración, que favorecieron a las cepas que presentaron mayor capacidad para competir por el sustrato y utilizan con mayor facilidad los nutrientes disponibles en el medio. Es importante mencionar que *A. alternata* alcanzó su máximo crecimiento micelial en la placa Petri después de diez días.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Alternaria alternata* enfrentado con cada una de las cepas antagonistas evaluadas.

Enfrentamiento	Evaluación 120 Horas							
	Testigo	Aa vs Th	Aa vs Tv	Aa vs Tvs	Aa vs Tr6	Aa vs T247	Aa vs Pc	Aa vs Cr
Repetición 1	2.74	0.95	0.98	1.13	1.00	1.33	1.54	1.08
Repetición 2	2.66	0.98	0.99	1.15	1.01	1.38	1.50	1.12
Repetición 3	2.73	0.97	1.01	1.18	1.05	1.39	1.48	1.03
Repetición 4	2.74	0.96	1.02	1.17	1.04	1.41	1.61	1.11
Repetición 5	2.68	0.98	0.99	1.15	1.03	1.42	1.58	1.08
Promedio	2.71	0.97	1.00	1.16	1.03	1.39	1.54	1.08
PICR	0%	64.2%	63.1%	57.2%	62.0%	48.7%	43.2%	60.1%

Aa: *A. alternata* (testigo) Th: *T. harzianum*, Tv: *T. viride*, Tvs: *T. virens*, Tr6: *T. R6*, Pc: *P. chlamydosporia*, Cr: *C. roseum*

Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA) de valores promedios de PICR de enfrentamiento entre posibles hongos antagonistas frente a *Alternaria alternata* en comparación frente al testigo.

Tratamiento	Diámetro de cultivo	PICR
Testigo	2.71 ± 0.04	0*
Aa vs Th	0.97 ± 0.01	64.2*°
Aa vs Tv	1 ± 0.02	63.1*°
Aa vs Tvs	1.16 ± 0.02	57.2*
Aa vs Tr6	1.03 ± 0.02	62*°
Aa vs T247	1.39 ± 0.04	48.7*
Aa vs Pc	1.54 ± 0.05	43.2*
Aa vs Cr	1.08 ± 0.04	60.1*

* Diferencia significativa en relación a los valores observados con el testigo.

° No existe diferencia significativa entre los tratamientos.

La primera etapa de la selección de cepas con mayores propiedades antagonistas fue la evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), resultado obtenido del enfrentamiento entre el fitopatógeno y cada uno de las cepas antagonistas evaluados a través del método de placas duales. El mejor comportamiento lo presentó *Trichoderma harzianum* que presentó un valor de 64,2%, seguido de *Trichoderma viride*, y *Trichoderma R6*, con 63,1% y 62,0%, respectivamente. No obstante se asume que las cepas que presentaron el mayor porcentaje de PICR, con excepción de *Trichoderma viride* 247 y *Pochonia chlamydosporia* que en el presente trabajo, presentan una acción promisorio frente al patógeno.

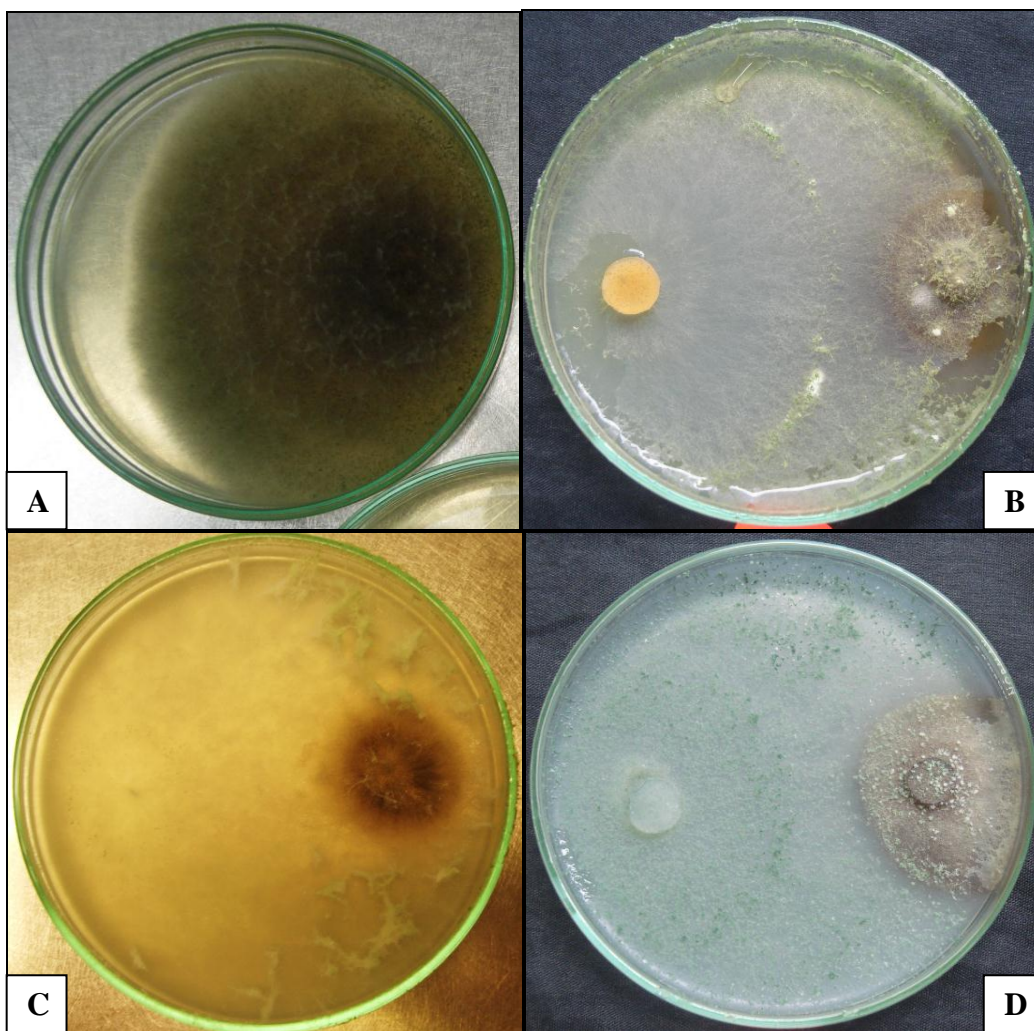


Figura 1. Cultivo dual para evaluar PICR. **A:** Testigo de *Alternaria alternata*. **B:** *T. harzianum* - *A. alternata*. **C:** *T. viride* - *A. alternata*. **D:** *T. R6* - *A. alternata*.

Todas las cepas antagonistas evaluadas poseen al menos un tipo de interacción hifal. La tabla 2 muestra estos resultados donde sobresalen las cepas de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* con tres tipos de interacción hifal, y destacando *Trichoderma R6* que presentó cuatro tipos de interacción hifal: penetración, despigmentación, la vacuolización y lisis de la pared celular.

Tabla 6. Tipos de interacción hifal entre las cepas antagonistas y *Alternaria alternata*.

Cepas evaluadas	Tipo de parasitismo
<i>Trichoderma harzianum</i>	E,P, V
<i>Trichoderma viride</i>	D, L,V
<i>Trichoderma virens</i>	P
<i>Trichoderma R6</i>	D,L,V,P
<i>Trichoderma viride</i> 247	L
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	L
<i>Clonostachys rosea</i>	P,V

D: despigmentación, E: enrollamiento, V: vacuolización,
P: penetración, L: lisis

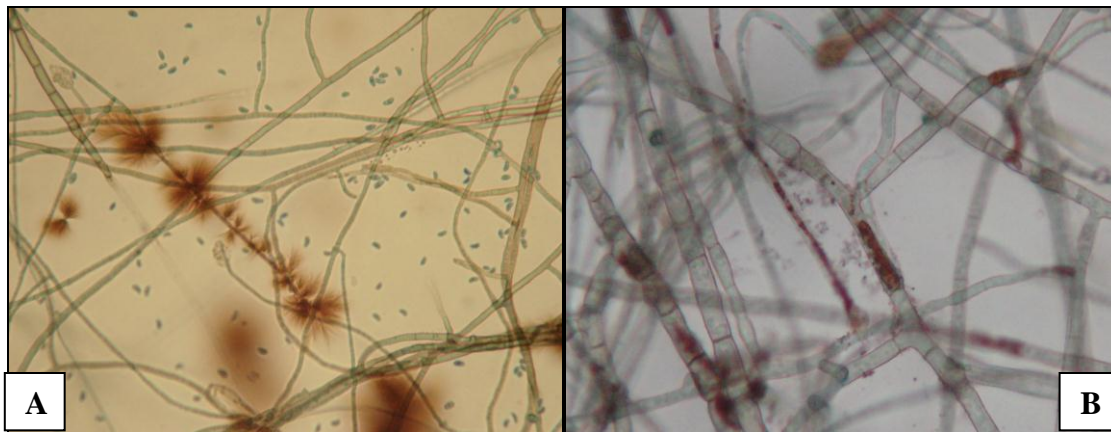


Figura 2. Observación microscópica a las 120 horas para evaluar la interacción entre los dos hongos. **A:** Lisis de conidios de *A. alternata*. **B:** Despigmentación de las hifas del fitopatógeno. Aumento de 63x.

En base a los resultados previos de enfrentamiento duales e interacción hifal mediante observación microscópica. Se seleccionaron las tres cepas que presentaron mayor actividad antagonica: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma R6*. Es importante anotar que la escala de Royse y Reis (1978) previamente planteada permite básicamente cuantificar competencia por nutrientes en el medio, pero no cuantificar como tal el micoparasitismo o antagonismo; porque en tal caso fue necesario la

evaluación microscópica del enfrentamiento entre el fitopatógeno y cada cepa antagonista evaluada.

5.2.- Efecto del filtrado obtenido de las cepas seleccionadas sobre el crecimiento de *Alternaria alternata*.

En total se evaluaron tres filtrados obtenidos de las cepas seleccionadas, con diferentes características en cuanto a la coloración y pH final (Figuras 3, 4 y Tabla 6). Para la producción de cada uno de ellos se requirió ajustar el inóculo a una concentración estándar de $1,0 \times 10^6$ conidios/mL. La determinación de la concentración de conidios por mililitros se realizó en CNB por medio del microscopio óptico y un objetivo de 63X.

Tabla 7. Características de los filtrados fúngicos producidos en el medio líquido, caldo Papa Dextrosa.

Cepa	Caldo Papa Dextrosa		
	Días de agitación	pH final	Color
<i>Trichoderma harzianum</i>	8	6	(+) Amarillo
	10	6	(+) Amarillo
	14	5.5	(-) Amarillo
	18	5.5	(-) Amarillo
<i>Trichoderma viride</i>	10	6.5	Transparente
	14	6.5	Transparente
	18	6	Transparente
	22	6	Transparente
<i>Trichoderma R6</i>	8	6	(+) Amarillo
	10	6	(+) Amarillo
	14	5.5	(-) Amarillo
	18	5.5	(-) Amarillo

(+): Mayor intensidad del color inicial del medio. (-): Menor intensidad del color inicial del medio.

En la figura 3, se presenta los filtrados obtenidos de las tres cepas evaluadas: *T. harzianum*, *T. viride*, y *T. R6*, evaluados hasta el día 14 de fermentación presentaron los mejores resultados de PCIR frente a *A. alternata*.

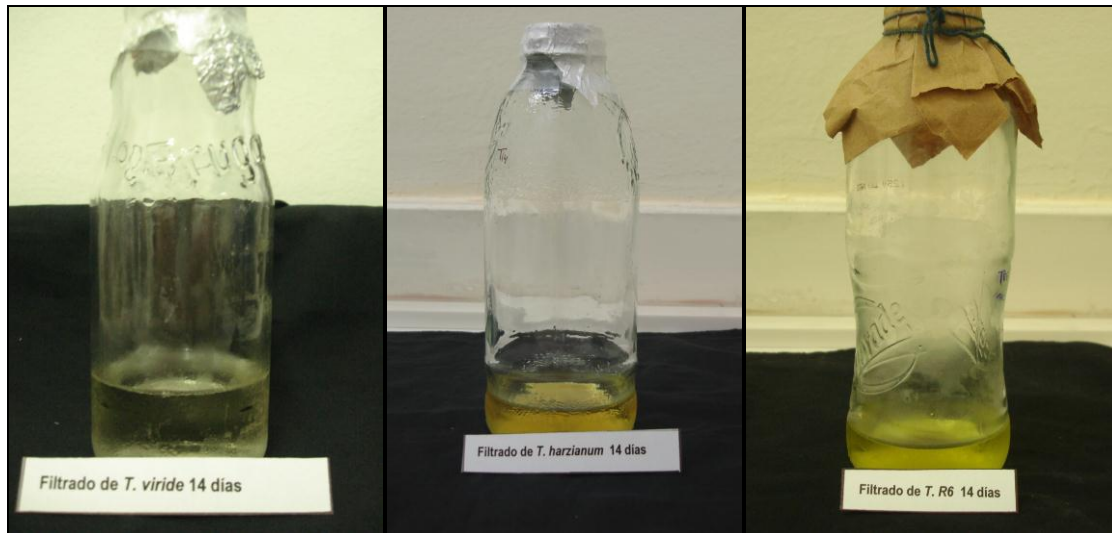


Figura 3. Filtrados obtenidos de la fermentación sumergida de cultivo (caldo Papa Dextrosa) de las tres cepas antagonistas con mejores resultados.

Los valores de porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de cada uno de los filtrados obtenidos conteniendo sustancias inhibitorias son presentados en la tabla 7. A partir de estos resultados y del análisis estadístico de los radios de crecimiento del fitopatógeno, se seleccionó la cepa *Trichoderma R6*, para los ensayos de campo, por presentar estadísticamente mayor eficacia para el control de *Alternaria alternata in vitro*. Es importante mencionar que no se observaron diferencias marcadas en el efecto de los filtrados producidos por la misma cepa, si se tiene en cuenta que con la cepa seleccionada los porcentajes de inhibición del crecimiento radial varió entre 79% y 85%.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Alternaria alternata* en medio PDA conteniendo los metabolitos inhibitorios de la cepas antagonistas evaluadas.

Filtrado/día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tv	8.13	-4.76	27.08	61.71	74.9	77.53	79.02	81.48	83.83	82.88
Th	8.13	19.04	41.66	66.40	79.70	81.10	82.42	81.64	85.32	80.51
Tr6	16.60	14.28	43.75	71.09	79.33	81.64	83.26	85.02	87.12	83.98

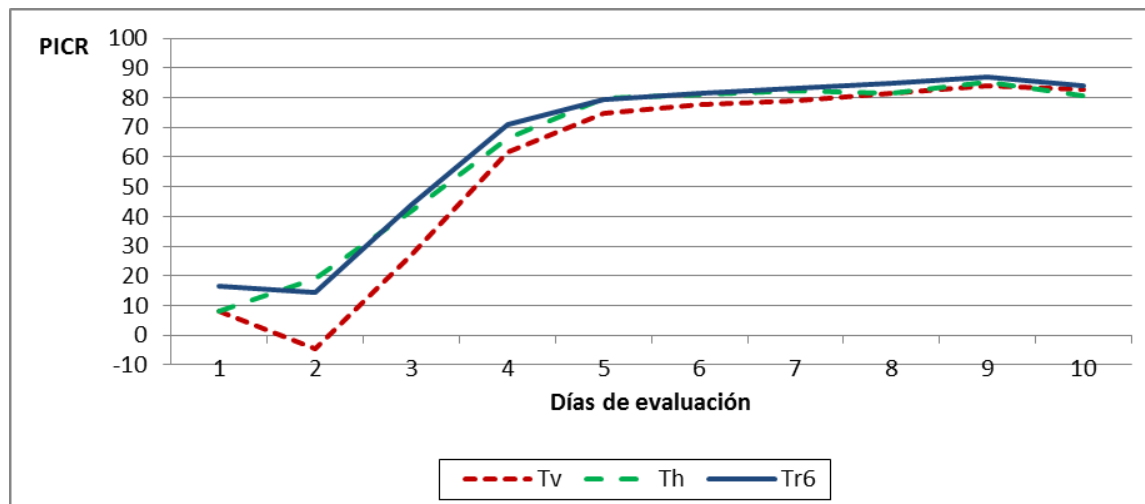


Figura 4. Tendencia de las curvas de los valores de PICR de los filtrados de las tres cepas, observando tendencias similares en los tres tratamientos; con un mayor predominio de Tr6.

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) de los valores del PICR del hongo fitopatógeno *A. alternata* en medio PDA más los filtrados de las cepas Tv, Th y Tr6 más un testigo evaluando la actividad metabólica inhibitoria de cada una de las tres cepas antagonistas.

Tratamiento	Día 1	Día 5	Día 10
Testigo	0*	0*	0*
Tv	5.17*	74.98*	82.75*°
Th	5.17*	79.56*°	80.55*
Tr6	15.52*	79.41*°	83.98*°

* Diferencia significativa en relación a los valores observados con el testigo.

° No existe diferencia significativa entre los tratamientos.

5.3.- Pruebas en laboratorio y campo.

5.3.1.- Localización del área de estudio.

El ensayo fue realizado bajo condiciones tanto de laboratorio como condiciones de campo en la localidad de San Luis, Cañete, ubicada aproximadamente a 10 Km al norte de San Vicente (13° 03' 58" Latitud Sur, 76° 24' 51" Longitud Oeste). Esta zona presenta un clima templado desértico con influencia marina. Las temperaturas varían entre una máxima media de 24.5 °C en el mes de febrero-marzo y una mínima en el mes de junio-julio de 16.4 °C. La precipitación anual es de 11.4 mm.

5.3.2.- Efectos de los filtrados obtenidos de la cepa *Trichoderma R6* en el control de la mancha parda de cítricos en campo.

5.3.2.1.- Incidencia de la enfermedad mancha parda de los cítricos en campo.

Los valores de incidencia de la enfermedad en los tres tratamientos: filtrado, conidios, y producto químico, se muestran en las tablas 10, 11, y 12.

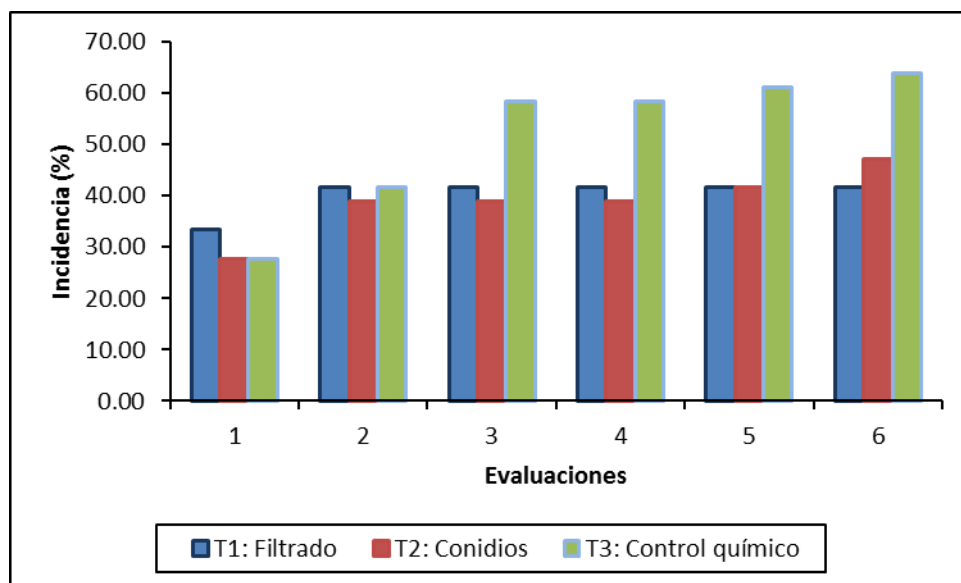


Figura 5. Porcentaje de incidencia del hongo *Alternaria alternata* en el cultivo de cítrico. Con los tratamientos: T1 (aplicación de filtrado con metabolitos), T2 (aplicación con conidios en sustrato arroz), T3 (aplicación de control químico (Mancozeb + Captan)).

5.3.2.2.- Severidad de la enfermedad mancha parda sobre el cultivo de cítricos.

Los mayores índices de severidad se reportaron en el tratamiento con el producto químico 47,0%, seguido por el tratamiento tradicional (conidios en sustrato arroz) con 46,0%, mientras que el tratamiento con el filtrado presentó un 23,0%, mostrando menor índice de severidad de la enfermedad (Figura 6, tablas 10, 11, y 12). Según escala de severidad de Horsfall-Barratt.

Grado	Área foliar afectada
1	0% (hoja sana)
2	1 a 25% de la hoja sana afectada
3	26 a 50% de la hoja sana afectada
4	51 a 75% de la hoja sana afectada
5	76 a 100% de la hoja sana afectada

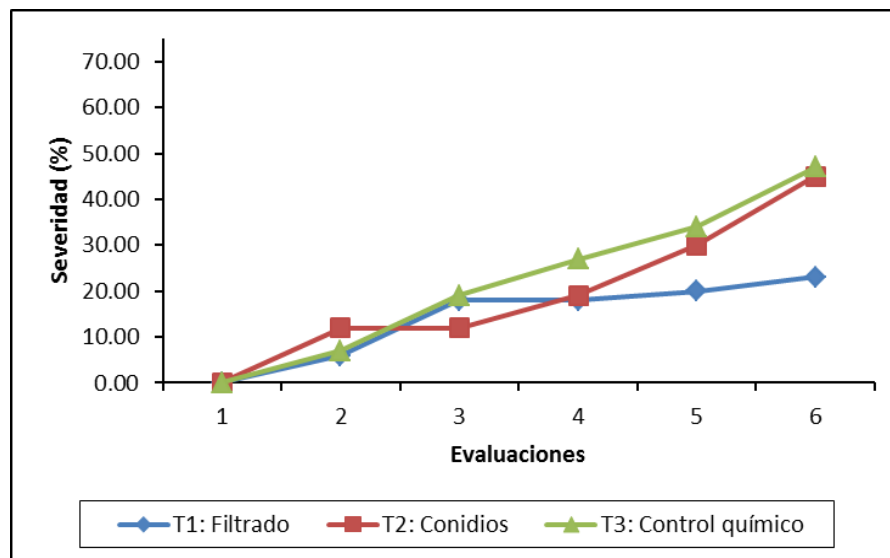


Figura 6. Porcentaje de severidad de la enfermedad mancha parda en el cultivo de cítricos. Evaluaciones realizadas durante 3 meses. Con los tratamientos: T1 (aplicación de filtrado con metabolitos), T2 (aplicación con conidios en sustrato arroz). T3 (aplicación de control químico (testigo)).

Los resultados obtenidos en el tratamiento con el filtrado se observó un grado de severidad 1 y 2 (tabla 10).

Tabla 10. Valores de porcentaje de incidencia y severidad del tratamiento con el filtrado (actividad metabólica inhibitoria) de hongo antagonista T. R6.

Evaluación/Grado	1	2	3	4	5
E1 (%)	66.67	33.33	0.00	0.00	0.00
E2 (%)	58.33	41.67	0.00	0.00	0.00
E3 (%)	58.33	41.67	0.00	0.00	0.00
E4 (%)	58.33	41.67	0.00	0.00	0.00
E5 (%)	58.33	41.67	0.00	0.00	0.00
E6 (%)	58.33	41.67	0.00	0.00	0.00

* **Grado de severidad, % Porcentaje de incidencia.**

Los métodos evaluados permitieron observar que el filtrado de cultivo de la cepa *Trichoderma R6* mostró actividad biológica inhibitoria sobre el crecimiento de *Alternaria alternata* (severidad, 25%) cuando se le cultiva en condiciones agitadas. El filtrado amarillo obtenido de la cepa *Trichoderma R6* no ocasionó daños sobre la hoja.

Los resultados obtenidos en el tratamiento con los conidios se observó un grado de severidad 1, 2 y 3 (tabla 11).

Tabla 11. Valores de porcentaje de incidencia y severidad del tratamiento con producto de arroz con conidios de hongo antagonista T. R6.

Evaluación/Grado	1	2	3	4	5
E1 (%)	72.22	27.78	0.00	0.00	0.00
E2 (%)	61.11	38.89	0.00	0.00	0.00
E3 (%)	61.11	38.89	0.00	0.00	0.00
E4 (%)	61.11	36.11	2.78	0.00	0.00
E5 (%)	58.33	30.56	11.11	0.00	0.00
E6 (%)	52.78	36.11	11.11	0.00	0.00

* **Grado de severidad, % Porcentaje de incidencia.**

Los resultados obtenidos en el tratamiento con el producto químico se observó un grado de severidad 1, 2 y 3 (tabla 12).

Tabla 12. Valores de porcentaje de incidencia y severidad del tratamiento con producto químico (testigo).

Evaluación/Grado	1	2	3	4	5
E1 (%)	72.22	27.78	0.00	0.00	0.00
E2 (%)	58.33	41.67	0.00	0.00	0.00
E3 (%)	41.67	47.22	11.11	0.00	0.00
E4 (%)	41.67	41.67	16.67	0.00	0.00
E5 (%)	38.89	41.67	19.44	0.00	0.00
E6 (%)	36.11	44.44	19.44	0.00	0.00

* **Grado de severidad, % Porcentaje de incidencia.**

Los mayores índices de severidad se reportaron en el tratamiento con el producto químico 47,0%, seguido por el tratamiento tradicional (conidios en sustrato arroz) con 46,0% de severidad; los cuales demostraron un discreto control de la enfermedad mancha parda de los cítricos. Sin embargo, el tratamiento con el filtrado con 23,0%, mostrando menor índice de severidad de la enfermedad, coincidiendo con las evaluaciones de la incidencia (Figura 7).

Los tres tratamientos el extracto, los conidios y el control químico se evaluaron entre si con el ANOVA y la prueba de significancia de Tukey (tabla13).

Tabla 13. Valores de grados de incidencia y severidad presentados por hojas de cítrico para cada tratamiento de fungicidas.

Evaluación	Tratamientos		Sig.
E1	Extracto	Conidios en arroz	0.675
		Control químico	0.426
	Conidios en arroz	Extracto	0.675
		Control químico	0.115
	Control químico	Extracto	0.426
		Conidios en arroz	0.115
E2	Extracto	Conidios en arroz	1.000
		Control químico	1.000
	Conidios en arroz	Extracto	1.000
		Control químico	1.000
	Control químico	Extracto	1.000
		Conidios en arroz	1.000
E3	Extracto	Conidios en arroz	0.709
		Control químico	0.073
	Conidios en arroz	Extracto	0.709
		Control químico	0.277
	Control químico	Extracto	0.073
		Conidios en arroz	0.277
E4	Extracto	Conidios en arroz	0.709
		Control químico	0.073
	Conidios en arroz	Extracto	0.709
		Control químico	0.277
	Control químico	Extracto	0.073
		Conidios en arroz	0.277
E5	Extracto	Conidios en arroz	1.000
		Control químico	0.005*
	Conidios en arroz	Extracto	1.000
		Control químico	0.005*
	Control químico	Extracto	0.005*
		Conidios en arroz	0.005*
E6	Extracto	Conidios en arroz	1.000
		Control químico	0.001*
	Conidios en arroz	Extracto	1.000
		Control químico	0.001*
	Control químico	Extracto	0.001*
		Conidios en arroz	0.001*

*Diferencia significativa en relación a los valores observados con el testigo.

5.3.2.3- Efecto de productos utilizados para el control de la mancha parda de los cítricos.

Los resultados obtenidos muestran claramente la eficiencia de control de los tres tipos de tratamientos, cuyo detalle se puede observar en la figura 9.

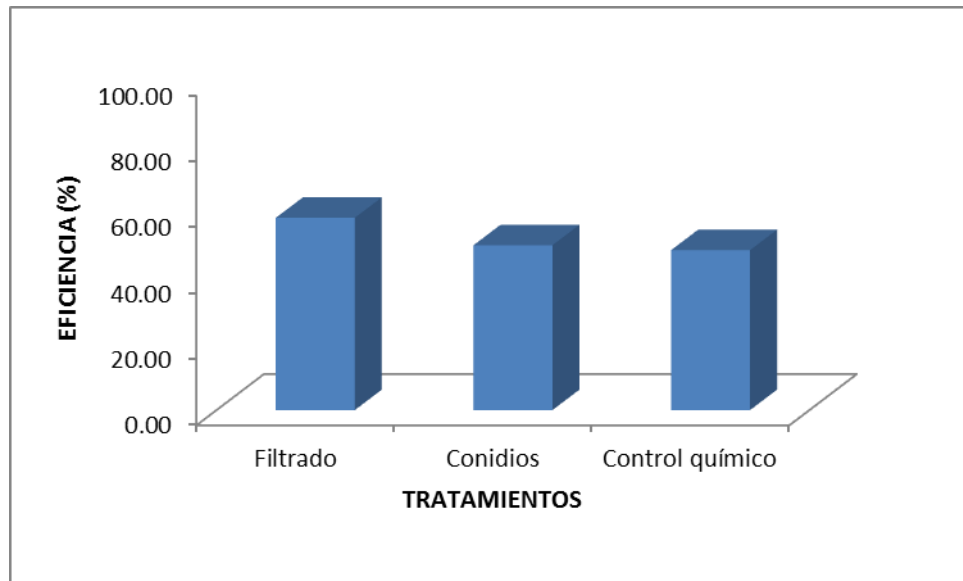


Figura 7. Efecto de dosis los productos utilizados para el control de la mancha parda en el cultivo de los cítricos. T1: aplicación de filtrado con metabolitos; T2: aplicación con conidios en sustrato arroz. T3: aplicación de control químico (testigo).

El tratamiento con el filtrado TR6 tuvo mayor eficiencia en el control de la mancha parda con (64,5%) de eficiencia, respecto a los otros tratamientos que reportaron índices menores al (conidios 56,7%, y fungicida químico 46,3%).

V.- DISCUSIÓN

6.1.- Selección de cepas de hongos con mayor propiedad antagónica sobre *Alternaria alternata*.

Se evaluaron siete cepas *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma viride* endófito 247, *Trichoderma R6*, *Pochonia chlamydosporia*, y *Clonostachys rosea*, para la prueba de cultivos duales que fueron capaces de inhibir el crecimiento del micelio del fitopatógeno hasta en un 64,2% (Tabla 4). Al respecto, los resultados obtenidos, tienen similitud a los reportes de (Michel-Aceves *et al.* 2001) y (Solano, 2004) quienes indican porcentajes de inhibición del 60 y 70% en interacciones de cepas nativas de *Trichoderma* spp contra *Fusarium oxysporum* (Schlechte) y *F. subglutinans* (Wollenweb y Reinking). Asimismo, se reportó un porcentaje de inhibición del 77,80% para *F. oxysporum* f.sp. lycopersici (Sac) Synder y Hansen (Michel- Aceves *et al.* 2005); sin embargo, no son tan sobresalientes a los resultados indicados por Hernández (2006), quienes utilizando cepas nativas de *Trichoderma* spp han obtenido hasta un 94% de inhibición contra *Sclerotium rolfsii* Sac., y de Ribamar y Oliveira (1988) hasta con un 100% de inhibición contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc.

Además, mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey estadísticamente las cepas *Trichoderma harzianum* (Th), *Trichoderma viride* (Tv) y *Trichoderma R6* (Tr6) fueron los tratamientos más efectivos al presentar PICR mayores en el enfrentamiento con el fitopatógeno (Aa), estos resultados justificaron continuar los análisis con estos 3 tratamientos descartando *Clonostachys rosea* (Cr) por encontrarse en el cuarto lugar en eficiencia del PICR. Tv y Th no presentaron diferencia

significativa ($p=0,803$), Tv y Tr6 no presentaron diferencia significativa ($p=0,852$), Tr6 y Cr no presentaron diferencia significativa ($p=0,107$).

Se pudo observar que los antagonistas según cada tratamiento, cubren externamente al fitopatógeno (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma endófito 247*), en otros casos forman un halo amplio en la zona de contacto de dicho enfrentamiento (*Trichoderma viride*). Seguidamente en los enfrentamientos en cultivos duales se observan que estos detienen el crecimiento del fitopatógeno con diferentes intensidades. Según la tabla 1, de acuerdo a los estudios realizados por Alippi y Monaco, 1993, *in vitro* deducen que el antagonismo en placa es una prueba inicial e importante que nos da una aproximación para los estudios subsiguientes de sistemas biológicos de control de enfermedades.

Se puede decir que para el tipo e intensidad del antagonismo *in vitro* por el método directo, es una prueba inicial para poder determinar el tipo de interacción por las características que presenta el enfrentamiento entre *A. alternata* con cada uno de las cepas antagonistas anteriormente evaluadas. Observamos diferentes tipos de interacción hifal según cada enfrentamiento fitopatógeno – antagonista, tales como alteraciones en la morfología de los conidios del fitopatógeno que corrobora los trabajos de Cisterna *et al.* 1994.

En el presente trabajo, todos los enfrentamientos de antagonistas evaluados poseen al menos un tipo de interacción hifal. En la tabla 2, se muestra estos resultados donde sobresalen las cepas *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma R6*, respectivamente con tres o más tipos de interacción hifal con predominio de penetración, enrollamiento y vacuolización, destacándose la cepa *Trichoderma R6* que

además provoca lisis celular en hifas del fitopatógeno. Diferentes autores hacen referencia a estos tipos de interacción hifal para el género *Trichoderma*, considerándolo como un agente de control biológico potencial para su uso como biocontrol de hongos del suelo. Bernal *et al.* (2004), encontraron enrollamiento y penetración de *Trichoderma* en *F. oxysporum* f.sp *cubense* (E.F. Smith) Snyd & Hans., Se encontró penetración en hifas de *Pythium* y *Rizhoctonia*. Los cambios estructurales que este antagonista produce a nivel celular se le atribuyen a los metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas que ellos producen como hiperparásitos (Harman *et al.* 2003).

Aunque generalmente las especies de *Trichoderma* son de crecimiento rápido y en pocas horas pueden cubrir la superficie de la placa Petri, que una cepa evaluada sea de crecimiento lento no lo excluye como buen antagonista tal es el caso de *Pochonia chlamydosporia* y *Clonostachys rosea*, ya que según Cundom *et al.* (2002), dicha característica, la tasa de crecimiento, no es obstáculo para que en tales hongos puedan encontrarse buenos potenciales agentes antagonistas.

Es importante mencionar que en el caso de los hongos nemátofagos, antagonistas de nematodos (parásitos de plantas y animales), además de ser muy buenos para usarlos como agentes de control biológico de nematodos parásitos, son capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos radiculares tales como: *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus*, *Lecanicillium lecanii* y *Pochonia rubescens*.

Los resultados del PIRC (tabla 4) a las 120 horas mostraron que todos los aislamientos de *Trichoderma* frente a *A. alternata* mostraron efecto inhibitorio, en el cual el antagonista ha crecido sobre el patógeno y actuó sobre él por antibiosis, micoparasitismo o penetración, resultando favorecido aquellos aislamientos que

presentan mayor capacidad para competir por el sustrato (Figura 1), ya que cubren el espacio vital y utilizan con mayor facilidad los nutrientes disponibles en el medio. El mejor comportamiento lo presentó la cepa *Trichoderma R6* que difiere de *T. harzianum* y *T. viride* por mostrar mayores tipos de interacción hifal a pesar de presentar el PICR (62,0%) más bajo, presentando una acción promisorio frente al patógeno. Estos resultados se corroboran con los obtenidos por Hernández *et al.* (2006) al evaluar *R. solani* aislada de piña en cultivo dual con diferentes aislados de *Trichoderma* inhibiendo el crecimiento radial entre un 40-50%. Se obtuvo una efectividad antagónica y micoparasítica de *Trichoderma* para el control de *Pyricularia grisea* (Sacc.) y *R. solani* aislados de arroz según (Reyes *et al.* 2006).

6.2.- Efecto del filtrado obtenido de *Trichoderma R6* sobre el crecimiento de *Alternaria alternata*.

El efecto directo de los metabolitos de cada cepa evaluada sobre el micelio de *A. alternata* se expresó en el PICR, resultados que ofrecen respuesta al origen de los cambios estructurales microscópicos que pueden ocurrir en el contacto entre el patógeno y las cepas evaluadas y corroboran los datos obtenidos anteriormente. Además de los posibles modos de acción atribuidos para los filtrados ubicados dentro de los grupos de inhibición media y alta del crecimiento micelial de *A. alternata*, pueden existir otros nuevos dependiendo de las moléculas productoras del efecto inhibitorio (Strobel y Daisy, 2003).

Las cepas utilizadas provinieron del cepario de SENASA, y demostraron un importante potencial en la producción de metabolitos antifúngicos con actividad alta y media, lo cual podría estar relacionado con su origen, si se tiene en cuenta el trabajo de Bills *et al.* (2002) quienes evaluaron el número de productos bioactivos naturales derivados de

microorganismos endofíticos. Además se observaron efectos sobre los conidios y sobre las hifas de *A. alternata*. Aunque en observaciones microscópicas se evidenció tubos germinales cortos con respecto al testigo patógeno al evaluar los tratamientos con los filtrados, no se pudo determinar su efecto respecto de la inhibición de la germinación producida por los filtrados evaluados. Estos podrían ser de interés si se tiene en cuenta que existe un grupo de fungicidas, que no previenen la germinación de conidios pero, a bajas concentraciones inhiben la elongación del tubo germinal y el crecimiento del micelio, debido a que interfieren con la biosíntesis de esterol (Rosslenbroich y Stuebler; 2000; Leroux, 2004).

Todos los filtrados del grupo de inhibición de crecimiento radial presentaron un pH ligeramente ácido. En la tabla 7, se presentan los valores de pH de cada uno de los filtrados con valores entre un rango de 5,5 a 6,5, esto se debe a que las cepas tienden a acidificar el medio para propiciar el desarrollo óptimo de su metabolismo, factor que puede estar relacionado con la identidad y metabolismo de cada cepa. Cabe mencionar que no existen muchos reportes que relacionen la producción de metabolitos antifúngicos con el pH y por lo tanto no se puede generalizar el valor de pH con un metabolito en particular, dado que esto depende de la naturaleza del compuesto y de la composición del medio de producción, entre otras variables (Cabrera, 2000).

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey, los filtrados de Tr6 y Th presentan una mayor eficiencia de PICR en el día 5 de evaluación, y Tr6 y Tv presentan una mayor eficiencia de PICR en el día 10 de evaluación. Comparando los valores de PICR, en las pruebas de enfrentamiento y en incorporación de placas por filtrado se observa una mayor eficiencia de PICR en la segunda prueba.

Donde destaca la cepa Tr6 por presentar un mayor valor de PICR al final de los 10 días de enfrentamiento.

En el primer día, no se observan diferencias significativas en la evaluación de eficiencia de los filtrados de Th, Tv y Tr6 con respecto al testigo. Para el quinto día, Th y Tr6 no presentan diferencia significativa ($p=0,998$); es decir, tienen el mismo efecto. Para el décimo día, Tv y Tr6 no presentan diferencia significativa ($p=0,108$); es decir, tienen el mismo efecto. En el primer día de evaluación de la actividad metabólica de los filtrados, los diámetros de crecimiento son tan pequeños que una centésima de diferencia en el valor de los diámetros puede originar diferencias matemáticas en el valor del PICR, pero que visualmente no es perceptible. Por otro lado, en los filtrados evaluados se encuentran los metabolitos secundarios con potencial antifúngico, ya que los extractos de una fermentación invariablemente resultan en mezclas complejas de cientos de compuestos como lo encontrado por Borders (1999). La producción de algunos compuestos con potencial inhibitorio puede desarrollarse bajo condiciones limitantes de nutrientes, como disminución de fuentes de C, N, o P fácilmente asimilables, esto conlleva a que el microorganismo entre en un período de crecimiento lento con alteraciones morfológicas y cambios en el metabolismo, lo que se conoce como metabolismo secundario de acuerdo con Drew y Demain, (1977), Schimmel *et al.* (1998); Turner (1971). Pueden presentarse a partir del día 1 con máximos niveles de concentración el día 3 (Zhang *et al.* 2001), o se presentan a partir del día 5 (Schimmel *et al.* 1998). La producción de metabolitos fúngicos, depende de las características de las moléculas y está influenciada por varios parámetros; temperatura, pH, oxígeno disuelto, entre otros según Brakhage *et al.* (2004); Calvo *et al.* (2002); Higgs *et al.* (2001); Saha *et al.* (2004).

En la etapa de evaluación del filtrado por incorporación, se evaluó la capacidad inhibitoria de los filtrados obtenidos de los días 8, 10, 14, 18 y 22 días a partir de la fermentación sumergida a 160 rpm y $25,0 \pm 2,0$ °C para cada una de las cepas evaluadas: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma R6*. En los medios APD incorporado con cada uno de los filtrados obtenidos cada día de evaluación, se sembró por puntura la cepa *Alternaria alternata* realizándose la medición radial de la colonia cada 24 horas durante 10 días con la finalidad de hacer la comparación con el crecimiento radial del testigo (*Alternaria alternata*) en un medio APD sin el filtrado incorporado para determinar el PICR y/o capacidad de inhibición del filtrado que contenga los mayores efectos inhibitorios a través de la mayor inhibición del crecimiento micelial de *Alternaria alternata*. Se determinó entonces que el filtrado obtenido en el día 14 de la cepa *Trichoderma R6* presentó la mayor capacidad inhibitoria (87,12%) en comparación con las cepas *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* (85,32 y 83,83%; respectivamente) evaluados el mismo día 14. Esto indica que aunque los microorganismos pueden producir sustancias de bajo peso molecular con efectos antifúngicos, su obtención es particular para cada cepa o metabolito de interés de acuerdo con Broberg *et al.* (2004).

Según Thines (2005) la producción de compuestos de este tipo ocurre principalmente bajo condiciones limitantes de nutrientes y depende en gran medida de las vías de síntesis de productos naturales ya que los metabolitos secundarios no siempre tienen un único origen biosintético y su producción se puede derivar de diversas rutas metabólicas asociadas con el desarrollo del hongo, la formación de esporas, pigmentos u otras estructuras, dentro de las que hay procesos anabólicos del metabolismo de ácidos, proteínas, lípidos, entre otros compuestos (Calvo *et al.* (2002); Keller y Hohn, 1997; Marzluf, 1997).

6.3.- Pruebas en campo.

Las pruebas de antagonismo *in vitro* permitieron realizar la selección preliminar de cepas con específicos requerimientos para un sistema controlado, es decir, medir propiedades antagónicas a través de pruebas de competencia, micoparasitismo y producción de metabolitos biológicamente inhibitorios, el cual se refiere a observaciones microscópicas en las que se ve una interacción directa entre estructuras del antagonista y el fitopatógeno e interacción indirecta por antibiosis a través de sustancias inhibitorias. Invariablemente, las pruebas de antagonismo *in vitro* requieren ser corroboradas en condiciones de invernadero y campo, porque no siempre los hongos que actúan como antagonistas bajo condiciones controladas tienen la capacidad potencial de usarse en el control biológico, como se ha demostrado en otros experimentos con aislamientos usados en este estudio. Esto se debe a que el hongo antagonista puede modificar o actuar diferente de acuerdo con las características del suelo y las sucesiones microbianas particulares en sistemas *in vivo* Garveba *et al.* (2004).

6.3.1.- Incidencia de la enfermedad mancha parda de los cítricos en campo.

El comportamiento de los tres tratamientos, se muestra claramente que las evaluaciones se realizaron desde la fase de germinación, floración, fructificación y cuajado del fruto. Los períodos de evaluación fueron cada 15 días después de la aplicación de los filtrados. Se deduce que desde la primera hasta la cuarta evaluación se registró una incidencia gradual en todos los tratamientos de acuerdo al tipo de producto donde hasta la segunda evaluación se mantiene en un mismo nivel de incidencia de la enfermedad.

El tratamiento con el filtrado conteniendo los metabolitos activos antifúngicos, actuaron como fungicidas reduciendo la incidencia de la enfermedad mancha marrón, estos

aspectos también fueron corroborados por Villarroel (1997), Mercado (1997) y Balchin (1997), quienes mencionan que todo extracto de origen natural y con actividad en pruebas *in vivo* son considerados como fungicidas. Estos autores trabajaron con la actividad de extractos de la muña (Villarroel *et al.* (1997)) en la reducción de la mancha en haba, los mismos no presentaron un verdadero efecto biocontrolador de plagas fúngicas. De acuerdo a Villarroel (1997) esto se debe a que se considera a estos extractos más como insecticidas.

6.3.2.- Severidad de la enfermedad mancha parda sobre el cultivo de cítricos.

Los resultados de severidad reportados coinciden con las evaluaciones de la incidencia, donde los tratamientos con menor efecto son aplicación de conidios y productos químicos que manifiestan 45 y 47% de gravedad respectivamente, en comparación con el tratamiento con el filtrado que presenta 23%, demostrando su importante actividad de control de la enfermedad mancha marrón de los cítricos.

6.3.3- Efecto de productos utilizados para el control de la mancha parda de los cítricos.

Se puede evidenciar que el comportamiento del filtrado presenta mejor eficiencia en el control de la enfermedad en relación a los otros tratamientos (58,3%), si se comparan los datos de la figura 7 con los datos de las figuras 5 y 6.

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples para determinar la eficiencia de cada uno de los tratamientos aplicado a plantas de cítrico, los productos a base del filtrado y conidios en sustrato arroz son los tratamientos más efectivos en comparación con el producto químico. Entre estos dos productos, los valores de incidencia y severidad son menores en las plantas tratadas con el filtrado

conteniendo los metabolitos inhibitorios. En la evaluación 5, se observan diferencias significativas en el tratamiento del producto químico (testigo) con el control biológico, y presenta el mismo efecto con el tratamiento extracto. En la evaluación 6, presentan diferencia significativa el tratamiento de producto químico (testigo) con los tratamientos control biológico y extracto; sin embargo, los tratamientos control biológico y extracto presentan el mismo efecto.

En la figura 7 se aprecia con mayor detalle la eficiencia de los tratamientos, donde se puede observar que el filtrado conteniendo los metabolitos inhibitorios antifúngicos que tiene la dosis más alta es más eficiente en el control de *Alternaria alternata*, reportando un 58,3% en relación a los otros tratamientos de conidios en sustrato arroz y producto químico con 50% y 48,2% respectivamente que también mantuvieron un comportamiento regular en el control del agente causante de la mancha parda de los cítricos.

Las hojas tratadas con el filtrado presentan un menor grado de severidad (G:2), en comparación con el producto químico testigo (G:3), y el control biológico (G:3). Para las evaluaciones 5 y 6, el control químico (testigo) presenta diferencias significativas con los tratamientos con filtrado (extracto) y conidios en arroz (control biológico). Para las evaluaciones 5 y 6, el producto filtrado (extracto) y conidios de arroz (control biológico) no presentan diferencia significativa ($p=1,00$); es decir, tienen el mismo efecto.

VI.- CONCLUSIONES

Los hongos antagonistas *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, y *Trichoderma R6* evaluados demostraron ser una fuente de compuestos con potencial para inhibir la germinación de *Alternaria alternata*.

Se seleccionó la cepa de *Trichoderma R6* por presentar un mayor porcentaje de inhibición contra *Alternaria alternata* tanto *in vitro* (82,67%) como *in planta* (incidencia 33,3%) en comparación a las otras cepas.

Se obtuvo los filtrados con mayor actividad biológica inhibitoria de la cepa seleccionada a partir de cultivos líquidos con un tiempo de agitación de 14 días.

Se determinó mediante pruebas de campo un mayor control contra “la enfermedad mancha parda de cítricos” por parte de los filtrados con los metabolitos inhibitorios en relación a los tratamientos con conidios en sustrato arroz y fungicidas químicos.

Los filtrados de *Trichoderma* spp representan el primer reporte para la inhibición de *Alternaria alternata* causante de la mancha parda de los cítricos en nuestro país.

Se demostró que el uso de metabolitos a partir de hongos antagonistas representa una alternativa más eficiente para el control de enfermedades fúngicas en comparación de los productos fungicidas químicos tradicionales.

VII.- RECOMENDACIONES

Las grandes posibilidades de uso de microorganismos en el control de enfermedades de vegetales, estimula a realizar el ensayo en condiciones de campo, orientándose de esta manera el trabajo de la siguiente manera: selección de las especies o líneas más eficientes de los organismos hiperparásitos o antagonicos; alteración del medio ambiente de manera que el hiperparásito o antagonista resulten favorecidos; aprovechamiento de las sustancias antibióticas que se producen y la aplicación precisa de los antagonistas de acuerdo con el ciclo de la enfermedad.

Desarrollar la caracterización estructural del extracto crudo para la separación, identificación, y cuantificación de los metabolitos bioactivos responsables de la actividad inhibitoria de fitopatógenos.

VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agosin, E., Volpe, D.; Muñoz, G.; San Martín, y R.; Crawford, A. 1997. Effect of culture conditions of spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 13, 225-232.
- Agrios, G. 1998. Fitopatología; 3era Edición; Editorial Limusa, México.
- Agustí, M. 2003. Citricultura. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Ahmad J, and Baker. 1987. Competitive saprophytic and cellulolytic activity of rhizosphere competent mutants of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 77: 358-362.
- Alippi, H.; Monaco, C. 1990. Antagonismo de hongos fitopatógenos y saprobios en suelos hortícolas. Revista Argentina de Microbiología. 22: 90-93.
- Andersen, B. *et al.* 2001. Chemical y morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycological Research 105: 291-299.
- Andrews, J. H.; and Kenerly C. M. 1978. The effects of a pesticide program on the non-target epiphytic microbial populations of apple leaves. Canadian Journal of Microbiology 24: 1058–1072.
- Baker, R.; Elad, Y.; and Chet Y. 1984. The controlled experiment in the scientific method with special emphasis in biological control. Phytopathology 74: 1019-1021.
- Balchín, I. 1997. Bioactivity of new zeland medician Plant Essential Oil. Journal of applied Microbiology London, pp 22-23.
- Barnett, H. L.; y Hunter, B. B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. (3a Ed.). Minneapolis: Burgess Publishing Company.
- Bell, D.; Wells and Warkham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72: 379-382.

- Benhamou, N. & Chet, I. 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2095 – 2099.
- Bernal A, Andreu C, Moya M. 2004. Utilización de *Trichoderma* spp. como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hans. Cuba. Disponible en: <http://www.virtualcentr.org/es/enIBTJ%20Tallr/bernalalezander.htm>.
- Bissett, J. 1984. A revisión of the genus *Trichoderma*. II. Section Longibrachiatum sect. Nov. *Canadian Journal of Botany*, 62, 924-931.
- Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Intrageneric classification *Canadian Journal of Botany*, 69, 2357-2372.
- Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Section Pachybasium *Canadian Journal of Botany*, 69, 2372-2417.
- Bissett, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section Longibrachiatum *Canadian Journal of Botany*, 69, 2418-2420.
- Blakeman, J. & Fokkema, N. 1982. Potencial for biological control of plant diseases on the Phylloplane. *Annual Review of Phytopathology*, 20 167 – 192.
- Borders, D. 1999. Isolation and identification of small molecules. Demain, A.; Davies, E. (eds.) *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. 2° Edition. American Society for Microbiology. Washington, D.C., USA. Pp. 257-263.
- Brakhage, A. A.; Spröte, P; Al-Abdallah, Q.; Gehrke, A.; Plattner, H.; Tüncher, A. 2004. Molecular biotechnology of fungal beta-lactam antibiotics and related peptide synthetases: Regulation of Penicillin Biosynthesis in Filamentous Fungi. Chapter: p. 45. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Publisher: Springer-Verlag Heidelberg Online. www.springerlink.com.

- Brako L. & J. Zarucchi. 1993. Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Missouri Botanical Garden.
- Brizuela, M.; García, L.; Mansur, M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Rev. Iberoam. Micol. 15: 69 – 74.
- Broberg, A.; Pohanka, A. Sjögren, J.; Kenne, L. 2004. Screening, isolation and identification of metabolites from microorganisms with antifungal activity. Workshop on Semiochemicals and microbial antagonists: Their role in integrated pest management in Latin America. Turrialba, Costa Rica.
- Brunner, K.; Zeilinger, S.; Ciliento, R.; Woo, S.; Lorito, M.; Kubicek, C.; Mach, R. 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. Applied and Environmental Microbiology 71: 3959-3965.
- Buck, J. W. 2004. Combinations of fungicides with phyloplane yeast for improved control of *Botrytis cinerea* on geranium seedlings. Phytopathology 94: 196-202.
- Cabrera, L. 2000. Aporte al conocimiento de la microbiota fúngica del suelo de la amazonía Colombiana, con énfasis en tres grupos funcionales. Trabajo de grado (Biólogo). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia pp 326.
- Calvo, A. M.; Wilson, R. H.; Bok, J. W.; Keller, N. P. 2002. Relationships between secondary metabolism and fungal development. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66: 447-459.
- Canihos, Y.; Peever, T.L.; and Timmer, L.W. 1999. Temperature, leaf wetness, and isolate effects of infection of Minneola tangelo leaves by *Alternaria* sp. Plant Dis. 83, 429-433.

- Cañedo, V.; y Teresa A. “Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos”. Centro Internacional de la Papa (CIP), 2004. Disponible en: <http://cipotato.org/library/pdfdocs/AN65216.pdf>.
- Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. Curso de posgrado del Doctorado regional de ciencia y tecnología de los alimentos. Pp 81 - 86.
- Casamayor, R.Y; Gromas, M. 1985. Control de malas hierbas.
- Chet, I.; y Baker R. 1980. Induction of supressivenes to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopatology* 70: 994-998.
- Ciancas, J. 2006. Efecto biocontrolador de la cepa *Trichoderma inhamatum* BOL 12 QD-1 sobre el fitopatógeno *Botrytis cinerea* causante de la mancha chocolate en cultivos de haba de la comunidad de Chirapaca. 103 pp. Tesis para optar al título de Magister Scientiarum – Universidad Mayor de San Andrés, La Paz.
- Cisterna *et al.* 1994. Sintomatología y hongos asociados al manchado del grano de arroz en el genotipo Irga 409. *Revista de la Facultad de Agronomía La Plata*, 70: 13-21.
- Csiktunádi, K.; Forgacs, E.; Cserhati, T.; Vizcaino, J. 2000. Colour pigments of *Trichoderma harzianum*. Preliminary investigations with thin-layer chromatography-fourier transform infrared spectroscopy and high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *Journal of chromatography A*, 896 61-68.
- Cundom, M. A.; S. M. Mazza de Gaiad; M. A. Mazzati de Castañón; S. A. Gutiérrez de Arriola y M. Coutinho. 2002. Actividad antagónica *in vitro* de Hongos saprófitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. En: <http://www.unne.edu.ar/cyt/agrarias/a-037.pdf>.

- Davies, F.; Albrigo, G. 1994. *Citrus*. C.A.B. International. Great Britain 244 pp.
- De la Cruz, J.; and A. Llobel. 1999. Purification and properties of a basic endo- β -1,6-glucanase (BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. European Journal Biochemical FEBS 265: 145-151.
- Dennis, C.; and J. Webster. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. Br. Mycol Soc. 57(1): 25-39.
- Dickinson, C. H. 1976. Fungi on the serial surfaces on higher plants. In Microbiology of aerial plant surfaces. Eds. C.H. Dickinson and T. F. Preece. Pp 293-324. Academic Press, London.
- Dickinson, C. H.; and Wallace, B. 1976. Effect of late applications of foliar fungicides on activity of microorganisms on winter wheat flag leaves. Transactions of the British Mycological Society 76, 103-112.
- Doorenbos, J. 1992. Crop Water requirements. FAO Irrigation and Drainage paper 24. Rome, 143 p.
- Doorenbos, J.; and A. H. Kassam. 1986. Yield response to water. FAO Irrigation and Drainage paper 33. Rome, 133 p.
- Drew, S.W.; and Demain, A.L. 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. Annual Review of Microbiology 31, 343-356.
- Edgington, L.; Barron, G. L.; y Khew, K. L. 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology 61: 42-44.
- Elad, Y.; Chet, I; y Katan, J. 1980. Physical, biological, and chemical control integrated for soilborne diseases in potatoes. *Phytopatology* 70: 119 – 121.
- Elad, Y.; Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. European journal of Plant Pathology 105: 177-189.

- Elad, Y.; and Zimand, G. 1991. Experience in integrated chemical– biological control of grey mould (*Botrytis cinerea*). Contribution from the Agricultural Research Organization. Agriculture Volcanic Center. Bet Dagan, Israel 3274: 195-199.
- Escande, A. Pedraza y Agüero. 1999. Evaluación de *Gliocadium* spp y *Trichoderma* spp para el biocontrol de la pudrición humeda del capítulo del girasol (*S. Sclerotium*). Revista Argentina de Fitopatología 34 (2): 53.
- FAO. 1990. Plagas de las hortalizas. Manual de manejo integrado Stgo. de Chile. 550 pp.
- Farooqi, W; Malik, M; Shaukat, G; y Ahmad, M. 1985. Influence of pH on the growth of *Alternaria citri* on citrus fruit juice. Proc. Fla. State Hort. Soc. 98: 214 – 215.
- Fokkema, N. J. 1973. The role of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. Physiol. Plant Pathology. 3:195-205.
- Fokkema, N.; Nooij, M. 1981. The effect of fungicides on the microbial balance in the phyllosphere. EPPO Bull, 11, 303-310.
- Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Annual review of Phytopathology 26: 75-91.
- French, E.; y F. Herbert. 1998. Métodos de investigación fitopatológica; Edit IICA Costa Rica.
- García, Rosaima; Durán, María; y Riera, Ramón. 2006. Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* por fermentación líquida. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal Ciudad de la Habana, Cuba. Fitosanidad Vol. 10. N° 4, pp 295-298.

- Gainza, A. "Diseminación del patógeno *Alternaria alternaria* Fr. (Keissler) pv. Citri Solel "Mancha parda de mandarinas y tangelos" en costa central y algunas medidas de control." En: Procitrus, Asociación de Productores de Cítricos del Perú. Boletín informativo trimestral N° 43. Julio-Diciembre 2009. Disponible en: http://www.procitrus.org/pdf/citrinotas/citrinotas_43.pdf
- Garret. S. 1965. Ecology of soil-borne plant pathogens. Prelude to biological control. En: Baker, F., y Snyder, W. (Eds). Toward biological control of soil-borne plant pathogens (pp. 4 – 17), California: University California Press.
- Garveba, P.; J.A. van Veen y J.D. van Elsas. 2004. Microbial diversity in soil: Selección of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. Annu. Rev. Phytopathol. 42(2), 243-270.
- Hadar, Y., Chet, I., Henis, Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69: 64-68.
- Harman, Gary E; Kubicek, Christian P. 1998. *Trichoderma & Gliocladium*. Enzymes, biological control and commercial applications. Volume 2. Ed. Taylor & Francis Ltd 1998.
- Harman, E.G. 2003. *Trichoderma harzianum*, *T. viridis*, *T. koningii*, *T. hamatu* (Deuteromycetes: Moniliales). Disponible en: <http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.html>.
- Henderson, C. F.; and Tilton, E. 1955. Test with acaricides against the brown mite. *Journal of Economic Entomology*, 48: 157-161.
- Hernández, M. A.; Sierra, P. A.; Carr, A. 2006. Evaluación *in vitro* del antagonista de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las

- vitroplantas de Piña. (*Ananas comosis* L. Merr). Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana.
- Higgs, R. E.; Zahn, J.; Gygi, J. D.; Hilton, M. D. 2001. Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 371-376.
 - Highley, T.L.; y Green III, F. 1997. "Mechanism of Brown-rot decay: paradigm or paradox". *International Biodeterioration y Biodegradation*. Vol. 39. Nº2-3: 113-124.
 - Hislop, E. C. 1976. *Microbiology of aerial plant surfaces*. Eds. C.H. Dickinson and T. F. Preece. Pp 40-74. Academic Press, London.
 - Horsfall, J. G. and Barratt, W. R. 1945. An improving grading system for measuring plant disease. *Phytopathology* 33:655.
 - Howell, C., Hanson, L., Stipanovic, R., Puckhaber, L. 2000. Introduction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90: 248 – 252.
 - Imtiaj, Ahmed; Lee, Tae – Soo. 2008. Antagonistic effect of three *Trichoderma* Species on the *Alternaria porri* pathogen of onion blotch. *World Journal of Agricultural Science* 4(1): 13 -17.
 - Keller, N.; Hohn, T. 1997. Metabolic pathway gene clusters in filamentous Fungi. *Fungal Genetics and Biology* 21: 17-29.
 - Kiely, T. B. 1964. Brown spot of Emperor mandarin. *Agricultural Gazette of New South Wales*. 75: 854 – 856.
 - Kookana, Rai; and Simpson, B. 2000. Pesticide fate in farming systems: research and monitoring. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, vol. 56, pp. 463-471.

- Kuhls, K.; Lieckfeldt, E.; Sammuels, G. J.; Meyer, W.; Kubiack, C. P.; y Börner, T. 1997. Revision of *Trichoderma* sect. Longibrachiatum including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, 89, 442-460.
- Lacey, J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*: 11S-25S.
- Leroux, P. 2004. Chemical control of *Botrytis cinerea* and its resistance to chemical fungicides. Elad, Y. *et al.* (eds). *Botrytis: Biology, pathology and control*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. Pp 195-222.
- Lubbe, K. 2001. En: ARC-Fynbos cultivation course. Chapter 8 Plant Protection for fynbos crops-disease management. Elsenburg, South Africa, LNR-ARC. Pp 1-34.
- Madi, N.S.; Harvey, L.M.; Mehler, A.; and McNeil B. 1997. Synthesis of two distinct exopolysaccharide fractions by cultures of the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydr Polym* 32: 307-314.
- Madigan, M. 1991. *Biology of Microorganisms*. 6th ed. New Jersey, Prentice Hall, 874 pp.
- Marín, J. E., Fernández, H. S., Peres, N., Andrew, A. M., Peever, T. L., Timmer, L. W. 2006. First Report of Alternaria Brown Spot of Citrus Caused by *Alternaria alternata* in Peru. *The American Phytopathological Society. Plant Disease*. Vol. 90: 686.
- Marín, S. “*Trichoderma* spp. Modos de acción, eficacia y usos en el cultivo del café”. En: Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Boletín técnico Cenicafe N° 38. 2012.

- Martínez, J. T. 1998. Uso de *Trichoderma* para el Control Biológico de Organismos Patógenos de Plantas. Cuauhtémoc, Chih. México.
- Marzluf, G. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the Fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 17-32.
- Mercado, M. 1997. Investigación e identificación de especies vegetales con actividad antifúngica. Tesis Lic. En Bioquímica y Farmacia, UMSA, pp. 32-54.
- Michel-Aceves, A.C. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp., (Euascomicetes, Hypocreales), su antibiosis y parasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes: Hyphales). Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México. 162 p.
- Michel-Aceves, A.C.; Reyes-De la Cruz, A.; Otero-Sánchez, M.A.; Rebolledo-Domínguez, O.; y Lezana-Gutiérrez, R. 2005. Potencial antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 284-291.
- Ministerio de Agricultura, 2011. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe/home.php>.
- Ministerio de Agricultura, Lima Perú Información de Citricultura en el Perú. 2008.
- Molina, G; Zaldua, S; Gonzáles, G; y Sanfuentes, E. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales de Chile. *BOSQUE* 27(2): 126 – 134.
- Newhook, F. J.; Waterhouse, G. M.; and Stamps, D. J. 1978. Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycol. Pap.* 143: 1-20.
- O'Keeffe, M.; and Farrell, F. 2000. The importance of chemical residues as a food safety issue. *Irish Journal of Agricultural & Food Research* 39, 257-264.

- Pace, M. A., and R. Campbell. 1974. The effect of saprophytes on infection of leaves of *Brassica* spp. by *Alternaria brassicoh* Trans. Br. Mycol. SOC. 63:193-196.
- Poveda, D. 2006. Selección de extractos fúngicos extracelulares (EFE) con potencial para el control de *Botrytis cinérea* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Tesis de grado para optar al título de Microbiólogo industrial – Pontificia Universidad Javeriana, Bogota.
- Páez, M.E; Sanabria de Albarracin, N. 2007. Evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma koningii* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Rev. Fav. Agron. (LUZ). Supl. 1: 27 – 31.
- Palti, J. 1981. Cultural practices and infectious crop diseases. Advanced series in Agricultural Sciences. Springer – Verlag, Berlin, 243 pp.
- Papavizas, G. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology 23: 23 – 54.
- Parkinson, D. & Waid, J. 1960. The Ecology of Soil Fungi- Liperpool University Press.
- Poveda, D. 2006. Selección de extractos fúngicos extracelulares (EFE) con potencial para el control de *Botrytis cinérea* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Tesis de grado para optar al título de Microbiólogo industrial – Pontificia Universidad Javeriana, Bogota
- Quiroz-Sarmiento, V.F., R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcón, M.E. Lara-Hernández, 2008. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo de ajo. Revista Mexicana de Micología. 26:27-34.
- Reis, R. F., de Goes, A., Mondal, S. N., Shilts, T., Brentu, F. C., and Timmer, L. W. 2006. Effect of lesion age, humidity, and fungicide application on sporulation

- of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of tangerine. Plant Disease. Vol. 90:1051-1054.
- Reyes R.T.; Rodríguez G.G.; Pupo Z.D.; Alarcón P.L.; y Limonta C.Y. 2006. Efectividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* (Rifai) en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana.
 - Reyes, Y.; Martínez, B.; e Infante, Danay. 2008. Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. Rev. Protección Veg. Vol. 23. N° 2: 112 – 117.
 - Ribamar, de S. R. J.; and Oliveira, N. T. 1988. *In vitro* antagonistic potential of *Trichoderma* spp against *Colletotrichum gloeosporioide* agent of antracnose in the passion fruit (Passiflora). Boletín Micológico 13: 103-110.
 - Roberts, R. G. 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. Mycological Research 104: 151-160.
 - Rodriguez, V. 2002. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprófitos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatógeno causante del (Damping off) en plantas de tomate. 105 p. Tesis para optar el grado de Magíster en Microbiología - Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
 - Rosslenbroich, H-J.; Stuebler, D. 2000. Botrytis cinerea- history of chemical control and novel fungicides for its management. Special issue XIVth International Plant Protection Congress (IPPC). Edited and Reviewed paper from a congress held in Jerusalem, Israel in July 1999. Crop Protection 19: 557-561.

- Rossman, A. Y.; Samuels, G. J.; Rogerson, C. T.; y Lowen. R. 1999. Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). Stud. Mycol., 42, 1-248.
- Royse, D.; and S.M. Ries. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. Phytopathol. 68, 603-607.
- Ruesta, A. & Rodríguez, R. 1992. Manual Cultivo de la Vid en el Perú. Segunda Edición. Ediciones FUNDEAGRO. 15, 39, 161, 173 pp.
- Ruiz, E.; Tún, J. M.; Pinzón, L. L.; Valerio, G.; y Zavala, M. J. 2008. Evaluación de fungicidas sistémicos para el control del Mildiú veloso (*Pseudoperonospora cubensis* Berk. & Kurt.) Rost. en el cultivo del melón (*Cucumis melo* L.). Revista Chapingo Serie Horticultura 14(1): 79 – 84, 2008.
- Saha, M.; Ghosh, D.; Garai, D.; Jaisankar, P.; Sarkar, K. K.; Dutta, P. K.; Das, S.; Jha, T.; and J. Mukherjee. 2004. Studies on the production and purification of an antimicrobial compound and taxonomy of the producer isolated from the marine environment of the Sundarbans. Biotechnological Products and Process Engineering. Applied Microbiology and Biotechnology. Published online. www.springerlink.com.
- Samuels, G. J. 1996. Trichoderma: a review of biology and systematic of the genus. Mycological Research, 100, 923-935.
- Santamarina, M. P. Roselló, J.; Llacer, R.; Sanchis, V. 2002. Antagonistic activity of *Penicillium oxalicum* Corrie and Tom, *Penicillium decumbens* Thon and *Trichoderma harzianum* Rifai isolates against fungi, bacteria and insects *in vitro*. Rev Iberoam Micol 19: 99-103.

- Schimmel, T., Coffman, A., Parsons, S. 1998. Effect of Butyrolactone I on the Producing fungus, *Aspergillus terreus*. Applied and environmental Microbiology 64: 3707-3712.
- Seeley, H.W. & Van Demark, P.J. Microbios en acción. Manual de Laboratorio para Microbiología. Editorial Blume. Madrid.1973.
- Stefanova, N. & Sandoval, R. 1995. Efectividad de biopreparados de *Trichoderma* spp, en el control de fitopatógenos de suelo. Boletín Técnico CIV INISAV 2, 10 -22. Subramanian, C. 1983. Hyphomycetes: Taxonomy and Biology (1era Ed.). New York: Academic Press.
- Strashnov, Y.; Elad, Y.; Sivan, A.; and Chet I. 1985. Integrate control of *Rizhoctonia solani* by methyl bromide and *Trichoderma harzianum* plant. Pathology 34: 146-151.
- Strobel, G., Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and theie natural products. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67: 491-502.
- Thines, E. 2005. Institute of Biotechnology and drug research (IBWF), Department of biotechnology, University of Kaiserslautern, Germany.
- Timmer, L. W., Darhower, H. M., Zitko, S. E., Poover, T. L, Ibañez, A. M. and Bushong, P. M., 2000. Environmental factors affecting the severity of *Alternaria* brown spot of citrus and their potential use in timing fungicide applications. Plant Disease, 64: 638 – 643.
- Timmer, L. W., Peever, T. L., Solel, Z., and Akimitsu, K. 2003. *Alternaria* diseases of citrus – novel pathosystems. Phytopathologia mediterranea, 42: 3 - 16.
- Timmer, L. W., Solel, Z., Gottwald, T. R., Ibañez, A. M. and Zitko, S. E. 1998. Environmental factors affecting production, release, and field populations of

- conidia of *Alternaria alternate*, the cause of brown spot of citrus. *Phytopathology*, 88: 1218 – 1223.
- Torres, Enrique; Iannaccone, José; y Gómez, Hilda. 2008. Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia*, Campinas, v. 67, n.1, p.169-178.
 - Turner, W. B. 1971. Fungal metabolites. Academic Press, N.Y. pp. 14-23.
 - Ulloa Ulloa, C.; J. L. Zarucchi & B. León. 2004. Diez años de adiciones a la Flora del Perú: 1993-2003. *Arnaldoa* (Edic. Espec., Nov. 2004): 1-242.
 - Vicent, A; Badal, J; Sanz, N; Asensi, M.J.; García-Rellán, D; y Cuenca, F. 2003. La necrosis de hojas y frutos causada por *Alternaria alternata*. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Área de protección de los cultivos. *Vida Rural*: 46 – 47.
 - Vicent, A. 2007. Etiología y control de la mancha marrón de los cítricos en España. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 154 Pp.
 - Vilches - Martínez, F., Vilches - Mora, F., Vilches – Mora, F. J., Pérez – Gonzáles, J., y Cuenca, F. 2004. Ensayos preliminares con el fungicida Bellis (Piraclostrobin + Boscalid) para el control de *Alternaria alternata* pv. citri en el cultivo de cítricos cv. Fortune. *Levante Agrícola*, 373: 426 – 434.
 - Villarroel, D. 1997. Manejo de plagas. 1ed. Cadia Ballance. Cochabamba-Bolivia. Pp. 3-135.
 - Villarroel, D. 2000. Manejo ecológico de plagas prevención y control. Tesis de Maestría Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias. Dr. Martín Cárdenas, Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba-Bolivia, pp 3-40.

- Warren, R. C. 1972. Interference by common leaf saprophytic fungi with the development of *Phoma betae* lesions on sugarbeet leaves. *Ann. Appl. Biol.* 72:137-144.
- Wilson, C. L.; Wisniewski, M. E. 1994. Biological control of postharvest diseases – Theory and Practice-. Wilson and Wisniewski (ed). CRC Press, Inc. USA. Pp 180.
- Worasatit, N.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E. L.; and Rowland, C. 1994. Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single-spores isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological research* 98: 1357-1363.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1061 – 1070.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I. 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol. Biochem* 38; 863 – 873.
- Zaragoza, S. 1993. Pasado y presente de la citricultura española. Generalitat Valenciana, Serie Divulgación Técnica, n °8, Valencia, España.
- Zhang, H.; Tomoda, H.; Tabat, N.; Miura, H.; Namikoshi, M.; Yamaguchi, Y.; Masuma, R.; Omura, S. 2001. Cladospolide D, a new 12-membered macrolide antibiotic produced by *Cladosporium* sp. FT-0012. *The journal of Antibiotics* 54: 635-641.

IX.- ANEXO

a. Enfrentamiento de cultivos duales:

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.36	7	32	0.046

P<0.05

No existe homogeneidad de varianzas.

a.1 Análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el enfrentamiento de cepas de hongos antagonistas frente a *Alternaria alternata* en cultivos duales.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.852	7	1.693	1686.777	0
Within Groups	0.032	32	0.001		
Total	11.884	39			

P<0.05

Existen diferencias significativas entre cada una de las cepas enfrentadas con el fitopatógeno en los cultivos duales.

a.2 Prueba de Tukey (5%) para evaluar el diámetro de crecimiento de las colonias de *Alternaria alternata* frente a cada uno de los hongos antagonistas en los cultivos duales.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Cinco_d
Tukey HSD

(I) Tratamiento		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Testigo	Th	1.74200 [*]	.02004	.000	1.6771	1.8069
	Tv	1.71200 [*]	.02004	.000	1.6471	1.7769
	Tvs	1.55400 [*]	.02004	.000	1.4891	1.6189
	Tr6	1.68400 [*]	.02004	.000	1.6191	1.7489
	T247	1.32400 [*]	.02004	.000	1.2591	1.3889
	Pc	1.16800 [*]	.02004	.000	1.1031	1.2329
	Cr	1.62600 [*]	.02004	.000	1.5611	1.6909
Th	Testigo	-1.74200 [*]	.02004	.000	-1.8069	-1.6771
	Tv	-.03000	.02004	.803	-.0949	.0349
	Tvs	-.18800 [*]	.02004	.000	-.2529	-.1231
	Tr6	-.05800	.02004	.107	-.1229	.0069
	T247	-.41800 [*]	.02004	.000	-.4829	-.3531
	Pc	-.57400 [*]	.02004	.000	-.6389	-.5091
	Cr	-.11600 [*]	.02004	.000	-.1809	-.0511
Tv	Testigo	-1.71200 [*]	.02004	.000	-1.7769	-1.6471
	Th	.03000	.02004	.803	-.0349	.0949
	Tvs	-.15800 [*]	.02004	.000	-.2229	-.0931
	Tr6	-.02800	.02004	.852	-.0929	.0369
	T247	-.38800 [*]	.02004	.000	-.4529	-.3231
	Pc	-.54400 [*]	.02004	.000	-.6089	-.4791
	Cr	-.08600 [*]	.02004	.003	-.1509	-.0211
Tvs	Testigo	-1.55400 [*]	.02004	.000	-1.6189	-1.4891
	Th	.18800 [*]	.02004	.000	.1231	.2529
	Tv	.15800 [*]	.02004	.000	.0931	.2229
	Tr6	.13000 [*]	.02004	.000	.0651	.1949
	T247	-.23000 [*]	.02004	.000	-.2949	-.1651
	Pc	-.38600 [*]	.02004	.000	-.4509	-.3211
	Cr	.07200 [*]	.02004	.021	.0071	.1369
Tr6	Testigo	-1.68400 [*]	.02004	.000	-1.7489	-1.6191
	Th	.05800	.02004	.107	-.0069	.1229
	Tv	.02800	.02004	.852	-.0369	.0929
	Tvs	-.13000 [*]	.02004	.000	-.1949	-.0651
	T247	-.36000 [*]	.02004	.000	-.4249	-.2951
	Pc	-.51600 [*]	.02004	.000	-.5809	-.4511
	Cr	-.05800	.02004	.107	-.1229	.0069

T247	Testigo	-1.32400*	.02004	.000	-1.3889	-1.2591
	Th	.41800*	.02004	.000	.3531	.4829
	Tv	.38800*	.02004	.000	.3231	.4529
	Tvs	.23000*	.02004	.000	.1651	.2949
	Tr6	.36000*	.02004	.000	.2951	.4249
	Pc	-.15600*	.02004	.000	-.2209	-.0911
	Cr	.30200*	.02004	.000	.2371	.3669
Pc	Testigo	-1.16800*	.02004	.000	-1.2329	-1.1031
	Th	.57400*	.02004	.000	.5091	.6389
	Tv	.54400*	.02004	.000	.4791	.6089
	Tvs	.38600*	.02004	.000	.3211	.4509
	Tr6	.51600*	.02004	.000	.4511	.5809
	T247	.15600*	.02004	.000	.0911	.2209
	Cr	.45800*	.02004	.000	.3931	.5229
Cr	Testigo	-1.62600*	.02004	.000	-1.6909	-1.5611
	Th	.11600*	.02004	.000	.0511	.1809
	Tv	.08600*	.02004	.003	.0211	.1509
	Tvs	-.07200*	.02004	.021	-.1369	-.0071
	Tr6	.05800	.02004	.107	-.0069	.1229
	T247	-.30200*	.02004	.000	-.3669	-.2371
	Pc	-.45800*	.02004	.000	-.5229	-.3931

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

b. Evaluación de actividad metabólica de filtrados (PICR):

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Inicio	.748	3	16	.539
Medio	3.490	3	16	.040
Final	.440	3	16	.727

P<0.05

No existe homogeneidad de varianzas.

Análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el crecimiento de *Alternaria alternata* en un medio PDA incorporado con los filtrados obtenidos de la fermentación líquida de tres cepas antagonistas.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Inicio	Between Groups	.001	3	.000	1.341	.296
	Within Groups	.003	16	.000		
	Total	.004	19			
Medio	Between Groups	16.798	3	5.599	4209.980	.000
	Within Groups	.021	16	.001		
	Total	16.819	19			
Final	Between Groups	203.229	3	67.743	13407.823	.000
	Within Groups	.081	16	.005		
	Total	203.310	19			

P<0.05

Existen diferencias altamente significativas entre cada tratamiento de filtrados para inhibir el crecimiento del fitopatógeno.

Prueba de Tukey (5%) para evaluar el diámetro de crecimiento de *Alternaria alternata* en un medio PDA incorporado con el filtrado conteniendo los metabolitos inhibitorios.

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Inicio	Testigo	Filtrado Tv	0.006	0.00922	0.914	-0.0204	0.0324
		Filtrado Th	0.006	0.00922	0.914	-0.0204	0.0324
		Filtrado Tr6	0.018	0.00922	0.246	-0.0084	0.0444
	Filtrado Tv	Testigo	-0.006	0.00922	0.914	-0.0324	0.0204
		Filtrado Th	0	0.00922	1	-0.0264	0.0264
		Filtrado Tr6	0.012	0.00922	0.575	-0.0144	0.0384
	Filtrado Th	Testigo	-0.006	0.00922	0.914	-0.0324	0.0204
		Filtrado Tv	0	0.00922	1	-0.0264	0.0264
		Filtrado Tr6	0.012	0.00922	0.575	-0.0144	0.0384
	Filtrado Tr6	Testigo	-0.018	0.00922	0.246	-0.0444	0.0084
		Filtrado Tv	-0.012	0.00922	0.575	-0.0384	0.0144
		Filtrado Th	-0.012	0.00922	0.575	-0.0384	0.0144

Medio	Testigo	Filtrado Tv	2.03200 [*]	0.02307	0	1.966	2.098
		Filtrado Th	2.15600 [*]	0.02307	0	2.09	2.222
		Filtrado Tr6	2.15200 [*]	0.02307	0	2.086	2.218
	Filtrado Tv	Testigo	-2.03200 [*]	0.02307	0	-2.098	-1.966
		Filtrado Th	.12400 [*]	0.02307	0	0.058	0.19
		Filtrado Tr6	.12000 [*]	0.02307	0	0.054	0.186
	Filtrado Th	Testigo	-2.15600 [*]	0.02307	0	-2.222	-2.09
		Filtrado Tv	-.12400 [*]	0.02307	0	-0.19	-0.058
		Filtrado Tr6	-0.004	0.02307	0.998	-0.07	0.062
	Filtrado Tr6	Testigo	-2.15200 [*]	0.02307	0	-2.218	-2.086
		Filtrado Tv	-.12000 [*]	0.02307	0	-0.186	-0.054
		Filtrado Th	0.004	0.02307	0.998	-0.062	0.07
Final	Testigo	Filtrado Tv	7.38600 [*]	0.04496	0	7.2574	7.5146
		Filtrado Th	7.19000 [*]	0.04496	0	7.0614	7.3186
		Filtrado Tr6	7.49600 [*]	0.04496	0	7.3674	7.6246
	Filtrado Tv	Testigo	-7.38600 [*]	0.04496	0	-7.5146	-7.2574
		Filtrado Th	-.19600 [*]	0.04496	0.002	-0.3246	-0.0674
		Filtrado Tr6	0.11	0.04496	0.108	-0.0186	0.2386
	Filtrado Th	Testigo	-7.19000 [*]	0.04496	0	-7.3186	-7.0614
		Filtrado Tv	.19600 [*]	0.04496	0.002	0.0674	0.3246
		Filtrado Tr6	.30600 [*]	0.04496	0	0.1774	0.4346
	Filtrado Tr6	Testigo	-7.49600 [*]	0.04496	0	-7.6246	-7.3674
		Filtrado Tv	-0.11	0.04496	0.108	-0.2386	0.0186
		Filtrado Th	-.30600 [*]	0.04496	0	-0.4346	-0.1774

c. Incidencia y severidad de la enfermedad mancha parda de los cítricos:

Test of Homogeneity of Variances				
	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
E1	1.250	2	15	.315
E2	.	2	.	.
E3	.357	2	15	.705
E4	.357	2	15	.705
E5	.625	2	15	.549
E6	4.000	2	15	.041

$P < 0.05$

No existe homogeneidad de varianzas

Análisis de Varianza (ANOVA) de la evaluación de incidencia y severidad después de cada aplicación de la cepa *Alternaria alternata* en plantas de cítricos.

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
E1	Between Groups	2.111	2	1.056	2.317	0.133
	Within Groups	6.833	15	0.456		
	Total	8.944	17			
E2	Between Groups	0	2	0	0	1
	Within Groups	4.5	15	0.3		
	Total	4.5	17			
E3	Between Groups	3.111	2	1.556	2.979	0.081
	Within Groups	7.833	15	0.522		
	Total	10.944	17			
E4	Between Groups	3.111	2	1.556	2.979	0.081
	Within Groups	7.833	15	0.522		
	Total	10.944	17			

E5	Between Groups	5.444	2	2.722	9.423	0.002
	Within Groups	4.333	15	0.289		
	Total	9.778	17			
E6	Between Groups	7.111	2	3.556	13.913	0
	Within Groups	3.833	15	0.256		
	Total	10.944	17			

Prueba de Tukey para evaluación de incidencia y severidad de cada tratamiento sobre *Alternaria alternata* en plantas d cítrico.

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
E1	Extracto	Control Biológico (Conidios en arroz)	-0.33333	0.38968	0.675	-1.3455	0.6789
		Control químico	0.5	0.38968	0.426	-0.5122	1.5122
	Control Biológico (Conidios en arroz)	Extracto	0.33333	0.38968	0.675	-0.6789	1.3455
		Control químico	0.83333	0.38968	0.115	-0.1789	1.8455
	Control químico	Extracto	-0.5	0.38968	0.426	-1.5122	0.5122
		Control Biológico (Conidios en arroz)	-0.83333	0.38968	0.115	-1.8455	0.1789

E2	Extracto	Control Biológico (Conidios en arroz)	0	0.31623	1	-0.8214	0.8214
		Control químico	0	0.31623	1	-0.8214	0.8214
	Control Biológico (Conidios en arroz)	Extracto	0	0.31623	1	-0.8214	0.8214
		Control químico	0	0.31623	1	-0.8214	0.8214
	Control químico	Extracto	0	0.31623	1	-0.8214	0.8214
		Control Biológico (Conidios en arroz)	0	0.31623	1	-0.8214	0.8214
E3	Extracto	Control Biológico (Conidios en arroz)	0.33333	0.41722	0.709	-0.7504	1.4171
		Control químico	1	0.41722	0.073	-0.0837	2.0837
	Control Biológico (Conidios en arroz)	Extracto	-0.33333	0.41722	0.709	-1.4171	0.7504
		Control químico	0.66667	0.41722	0.277	-0.4171	1.7504
	Control químico	Extracto	-1	0.41722	0.073	-2.0837	0.0837
		Control Biológico (Conidios en arroz)	-0.66667	0.41722	0.277	-1.7504	0.4171
E4	Extracto	Control Biológico (Conidios en arroz)	0.33333	0.41722	0.709	-0.7504	1.4171
		Control químico	1	0.41722	0.073	-0.0837	2.0837
	Control Biológico (Conidios en arroz)	Extracto	-0.33333	0.41722	0.709	-1.4171	0.7504
		Control químico	0.66667	0.41722	0.277	-0.4171	1.7504
	Control químico	Extracto	-1	0.41722	0.073	-2.0837	0.0837
		Control Biológico (Conidios en arroz)	-0.66667	0.41722	0.277	-1.7504	0.4171

E5	Extracto	Control Biológico (Conidios en arroz)	0	0.31032	1	-0.806	0.806
		Control químico	1.16667*	0.31032	0.005	0.3606	1.9727
	Control Biológico (Conidios en arroz)	Extracto	0	0.31032	1	-0.806	0.806
		Control químico	1.16667*	0.31032	0.005	0.3606	1.9727
	Control químico	Extracto	-1.16667*	0.31032	0.005	-1.9727	-0.3606
		Control Biológico (Conidios en arroz)	-1.16667*	0.31032	0.005	-1.9727	-0.3606
E6	Extracto	Control Biológico (Conidios en arroz)	0	0.29187	1	-0.7581	0.7581
		Control químico	1.33333*	0.29187	0.001	0.5752	2.0914
	Control Biológico (Conidios en arroz)	Extracto	0	0.29187	1	-0.7581	0.7581
		Control químico	1.33333*	0.29187	0.001	0.5752	2.0914
	Control químico	Extracto	-1.33333*	0.29187	0.001	-2.0914	-0.5752
		Control Biológico (Conidios en arroz)	-1.33333*	0.29187	0.001	-2.0914	-0.5752

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.